

# **Neue Purinderivate als Inhibitoren der Proteinkinase ALK**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Laura Maria Schlütke  
aus Lingen (Ems)

1. Referent: Professor Dr. Conrad Kunick  
2. Referent: Professor Dr. Ingo Ott  
eingereicht am: 13.01.2016  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 08.04.2016

Druckjahr 2016

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Tagungsbeiträge**

Schlütke, L., Wölfel, S., Totzke, F., Schächtele, C., Kubbutat, M. H. G., Kunick, C.: 6,8-Disubstituted purines as inhibitors of anaplastic lymphoma kinase (ALK). (Poster) 248th ACS National Meeting & Exposition, San Francisco, 10. – 14.08.2014.

Schlütke, L., Preu, L., Totzke, F., Schächtele, C., Kubbutat, M. H. G., Kunick, C: Novel purine-based inhibitors of anaplastic lymphoma kinase (ALK). (Poster) DPhG Jahrestagung, Düsseldorf, 23. – 25.09.2015.



Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Februar 2013 bis Januar 2016 am Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter Anleitung von

**Herrn Professor Dr. Conrad Kunick,**

dem ich an dieser Stelle für die Überlassung des interessanten Themas, seine engagierte Betreuung und die schöne Zeit in seinem Arbeitskreis besonders herzlich danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt auch

**Herrn Professor Dr. Ingo Ott**

für die Übernahme des Koreferates



*meiner Familie gewidmet*





## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung .....	1
1.1 <i>Anaplastic lymphoma kinase</i> (ALK) .....	1
1.2 Aufbau der ALK .....	3
1.3 Resistenzentwicklung .....	6
1.4 Inhibitoren der ALK.....	8
1.5 Bindemodi etablierter ALK-Inhibitoren .....	17
1.6 Aufgabenstellung.....	24
2. <i>Molecular docking</i> .....	26
2.1 <i>Docking tool</i> GOLD.....	26
2.2 <i>Redocking</i> -Studien .....	27
2.3 <i>Docking</i> der Testverbindungen.....	30
2.4 Schlussfolgerungen .....	46
3. Synthese .....	47
3.1 Synthese von Purinderivaten.....	47
3.2 6-Chlor-8-(4-fluorphenyl)-9 <i>H</i> -purin-2-amin .....	56
3.3 1,3,4-Oxadiazol-2-thiole .....	65
3.4 Oxazol-2-thiol .....	69
3.5 Synthese der Testverbindungen.....	69
3.6 Massenspektrometrische Besonderheiten.....	81
4. Biologische Aktivität .....	84
4.1 Aktivitäten der Testsubstanzen.....	84
5. Physikochemische Eigenschaften.....	102
6. Zusammenfassung.....	107
7. Summary.....	109

8. Experimenteller Teil .....	111
8.1 <i>Molecular docking</i> .....	111
8.2 Geräte und Methoden.....	112
8.3 Synthesen und analytische Daten .....	117
8.4 Löslichkeitsuntersuchungen .....	177
8.5 Proteinkinase-Assay und biologische Daten .....	179
9. Literaturverzeichnis .....	193

## Abkürzungsverzeichnis

ABL: *abelson tyrosine kinase*; ACN: Acetonitril; AKT: Protein Kinase B; ALCL: *anaplastic large cell lymphoma*, anaplastisch großzelliges Lymphom; ALK: *anaplastic lymphoma kinase*; ATP: Adenosintriphosphat; BCR: *breakpoint cluster region*; CHN: Elementaranalyse; cKIT: *v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*; cMet: *hepatocyte growth factor receptor*;  $d_6$ -DMSO: deuteriertes Dimethylsulfoxid; DC: Dünnschichtchromatographie; DCM: Dichlormethan; DIPEA: *N,N*-Diisopropylethylamin; DLBCL: *diffuse large B-cell lymphoma*, diffus großzelliges B-Zell-Lymphom; DMF: *N,N*-Dimethylformamid; DMSO: Dimethylsulfoxid; EA: Ethylacetat; EGFR: *epidermal growth factor receptor*; EML4: *echinoderm microtubule-associated protein-like 4*; ERK: *extracellular-signal-regulated kinases*; FAK: *focal adhesion kinase*; FDA: *Food and Drug Administration*; FISH: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung; GAK: *cyclin G-associated kinase*; GHS: Glutathion; *gk*: *gatekeeper*; HMBC: *heteronuclear multiple bond correlation*; HPLC: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie; HRMS: *high resolution mass spectrometry*; HSQC: *heteronuclear single quantum coherence*; IHC: Immunohistochemie; IGF-1R: *insulin-like growth factor 1 receptor*; IMT: *inflammatory myofibroblastic tumour*, inflammatorisch myofibroblastischer Tumor; InsR: Insulin-Rezeptor Kinase; IR: Infrarot; JAK3: Janus Kinase 3; KRAS: *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*; LDLa: *low density lipoprotein class A*; LTK: *leukocyte receptor tyrosine kinase*; MW,  $\mu$ W: Mikrowelle; NBS: *N*-Bromsuccinimid; NMR: *nuclear magnetic resonance*; NPM: Nucleophosmin; NSCLC: *non-small cell lung cancer*, nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom; ORR: *objective response rate*; PDB: *protein data bank*; PE: Petrolether; PFS: *progression-free survival*; PI3K: *phosphoinositide 3-kinase*; PIM1: *proviral integration site for Moloney murine leukemia virus 1*; PLC $\gamma$ : Phospholipase C- $\gamma$ ; PRK1: *protein kinase C-related kinase 1*; RAS: *rat sarcoma*; ROS1: *ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase*; RP: *reversed phase*; RT: Raumtemperatur; RT-PCR: Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion; SAR: *structure activity relationship*, Struktur-Wirkungsbeziehung; SBDD: *structure based drug design*; Schmp.: Schmelzpunkt; SRC: *v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog*; STAT3: *signal transducer and activator of transcription 3*; STK22D: *serine/threonine kinase 22D*; TFG: *TRK-fused gene*;  $t_m$ : Totzeit; TPM:

Tropomyosin; Trk: *tropomyosin receptor kinase*; t<sub>r</sub>: Gesamtretentionszeit; TYRO3: *TYRO3 protein tyrosine kinase*; UV: Ultraviolett; VEGF-R2: *vascular endothelial growth factor receptor 2*; wt: *wildtype*; Zers.: Zersetzung; ZNS: Zentrales Nervensystem.

## 1. Einleitung

### 1.1 *Anaplastic lymphoma kinase (ALK)*

Bei der *anaplastic lymphoma kinase* (ALK) handelt es sich um eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die zu der Familie der Insulinrezeptor-Kinasen gehört.<sup>1, 2</sup> Kinasen sind phosphatgruppenübertragende Enzyme, die viele Faktoren im Zellzyklus regulieren und deren Fehlregulation zu verschiedenen Erkrankungen führt.<sup>3</sup> Kinasen sind damit ein attraktives Target für die Entwicklung von neuen Wirkstoffen in der medizinischen Chemie. Ziel ist die Entwicklung von ATP-kompetitiven Inhibitoren, da alle Kinasen ATP als Co-Substrat nutzen. Da die ATP-Bindungsdomäne jedoch hochgradig konserviert ist, sind die Unterschiede in diesem Bereich bei verschiedenen Kinasen gering. Daher ist die Entwicklung von selektiven Inhibitoren eine anspruchsvolle Aufgabe. Mit Imatinib (Glivec®) zur Behandlung von chronischer myeloischer Leukämie wurde 2001 der erste Kinase-Inhibitor zugelassen. Durch die Entdeckung der ALK im Jahre 1994 im Zusammenhang mit dem anaplastischen großzelligen Lymphom (ALCL) wurde ein neues Target für die Behandlung verschiedener Krebserkrankungen gefunden.<sup>4</sup>

Das ALK-Gen ist auf Chromosom 2p23 lokalisiert und kodiert für 1620 Aminosäuren.<sup>1</sup> Während die Funktion der ALK bei Erwachsenen bislang ungeklärt ist, scheint sie eine Rolle in der embryonalen Entwicklung, vor allem des Gehirns, zu spielen. Jedoch wird sie beim Erwachsenen nur im geringen Maße im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert.<sup>2</sup> Rezeptor-Tyrosinkinasen werden typischerweise durch Binden eines Liganden an die extrazelluläre Domäne aktiviert, was auf cytoplasmatischer Seite zu einer Initiierung verschiedener Signalwege führt. Im Zusammenhang mit der ALK werden verschiedene nachgeordnete intrazelluläre Signalwege, wie Ras/ERK, AKT/PI3K, JAK3/STAT3, PLCγ beschrieben. Diesen ist gemein, dass sie Zellwachstum, -differenzierung und -transformation und Apoptose beeinflussen.<sup>5, 6</sup> Als Liganden der ALK werden Pleiotrophin und Midkine diskutiert, bei beiden handelt es sich um heparinbindende Wachstumsfaktoren.<sup>7, 8</sup> Neuere Untersuchungen postulieren, dass Heparin selbst ein Ligand der ALK ist.<sup>9</sup>

Die Ausbildung von sogenannten Fusionsgenen wird in Zusammenhang mit einer Vielzahl verschiedener Krebserkrankungen gebracht. Fusionsgene bewirken häufig eine Aktivierung der entsprechenden Kinase und haben dadurch onkogenes Potenzial. Bislang wurden mehr als 20 verschiedene Gene beschrieben, die Translokationen mit ALK bilden.

So kann bei etwa 70% von anaplastischen großzelligen Lymphomen (ALCL) ein Fusionsgen aus Nucleophosmin (NPM) und ALK gefunden werden. Diese chromosomale Translokation führt zu einer Fusion der N-terminalen Domäne von NPM und der C-terminalen Domäne von ALK.<sup>4, 10</sup> ALCL ist eine Form von T-Zell-Lymphomen und macht etwa 25% der Non-Hodgkin-Lymphome bei Kindern und jungen Erwachsenen aus.<sup>4</sup> Zusätzlich wurde das Auftreten weiterer, seltener Fusionsgene bei ALCL beobachtet (TFG-ALK, TPM3-ALK, TPM4-ALK).<sup>11-13</sup>

Ein weiteres Fusionsgen, das aus ALK und dem *echinoderm microtubule-associated protein-like 4* (EML4) gebildet wird, tritt bei 2 – 5% der Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) auf.<sup>14, 15</sup> Lungenkrebserkrankungen sind der häufigste Grund für Krebstote weltweit.<sup>16</sup> ALK-positive NSCLC-Patienten zählen mit einem mittleren Alter von 52 Jahren zu einer jüngeren Patientengruppe. Außerdem sind sie tendenziell Nicht-Raucher und zeigen häufig die Histologie eines Adenokarzinoms.<sup>17</sup> Desweiteren kann NSCLC in selteneren Fällen mit diversen anderen Fusionsgenen der ALK assoziiert sein.

Weiterhin konnten bei inflammatorischen myofibroblastischen Tumoren (IMT) chromosomale Veränderungen des ALK-Gens nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um Weichteiltumore, die vor allem in Lunge und Abdomen vorkommen und Kinder und junge Erwachsene betreffen.<sup>18, 19</sup> Seit 1999 wurden verschiedene Fusionspartner beschrieben, wobei die TPM3-ALK- und TPM4-ALK-Fusionsproteine am häufigsten beobachtet werden.<sup>20, 21</sup>

Neuroblastome sind Tumore des autonomen Nervensystems, die aus entarteten, unreifen Zellen entstehen und von denen vor allem Kinder betroffen sind. Im Unterschied zu ALCL, NSCLC oder IMT kommt es in diesem Fall nicht durch Bildung von Fusionsgenen zu einer Aktivierung der ALK, sondern Mutationen der Keimbahnen und somatische Mutationen tragen zu der Entstehung von Neuroblastomen bei. Dabei werden bei ALK die R1275Q- und F1174L-Mutationen

am häufigsten beobachtet.<sup>22-24</sup> Außerdem können ALK-Amplifikationen ursächlich für Tumorentstehung sein.<sup>25, 26</sup>

Eine weitere Erkrankung, die in Zusammenhang mit einer Veränderung der ALK steht, ist das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL). Dabei kommt es zu malignen Veränderungen der B-Zellen, die die häufigste Form von Non-Hodgkin-Lymphomen bei Erwachsenen darstellt. In einigen Fällen von DLBCL kann unter anderem ein NPM-ALK-Fusionsgen beobachtet werden.<sup>27, 28</sup>

Veränderungen der ALK stehen demnach in Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen, sodass die ALK ein attraktives Target in der zielgerichteten Therapie darstellt. In der stratifizierten Medizin werden prädiktive Biomarker verwendet um zu entscheiden, ob ein Patient eine bestimmte genetische Veränderung aufweist, die dann gezielt für die Therapie genutzt werden kann. Dies wird bereits in der Behandlung verschiedener Krebserkrankungen mit Kinaseinhibitoren berücksichtigt.<sup>29, 30</sup> Zur Hemmung der *anaplastic lymphoma kinase* wurden Inhibitoren entwickelt, die vor allem bei der Behandlung von NSCLC zum Einsatz kommen. Diese Inhibitoren werden in Kapitel 1.4 vorgestellt. Zur Diagnostik von Veränderungen im ALK-Gen können verschiedene Methoden genutzt werden. Im Fall von ALK-positiven NSCLC-Patienten wird dazu vorrangig eine *fluorescence in situ hybridization* (FISH) angewandt. Weitere biomedizinisch genutzte Methoden zur Detektion von chromosomalen Veränderungen sind die Immunohistochemie (IHC) und die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).<sup>31</sup>

## 1.2 Aufbau der ALK

Die humane ALK ist aus den für Rezeptor-Tyrosinkinasen typischen Segmenten aufgebaut. Sie besteht aus einer extrazellulären Domäne, einem transmembranären Segment und einer intrazellulären Domäne.<sup>22, 32</sup> Die extrazelluläre Domäne umfasst eine Länge von 1020 Aminosäuren. Diese lässt sich weiter in zwei MAM-Komponenten, die von einer LDLa-Domäne unterbrochen werden, und einen Glycin-reichen Abschnitt unterteilen. Die extrazelluläre Domäne wird über ein transmembranäres Segment (21 Aminosäuren) mit der intrazellulären Domäne verbunden.<sup>32</sup> Der intrazelluläre Abschnitt gliedert sich in ein juxtamembranäres

Segment, die Proteinkinase-Domäne und ein carboxyterminales Ende und besteht aus 561 Aminosäuren. Wichtige Funktionen der ALK übernimmt die Kinase-Domäne, die sich aus den Resten 1116 – 1392 bildet.<sup>32</sup> Wie andere Kinasen auch zeigt die ALK in diesem Bereich einen typischen Aufbau. Es handelt sich dabei um die katalytische Domäne der Kinase, die für die Übertragung des Phosphatrestes zuständig ist. Sie umfasst eine N-terminale und eine C-terminale Domäne, die über die sogenannte *hinge*-Region miteinander verbunden sind (Abbildung 1-1). Im Übergangsbereich wird eine hydrophobe Tasche, die ATP-Bindetasche, ausgebildet.<sup>22</sup>

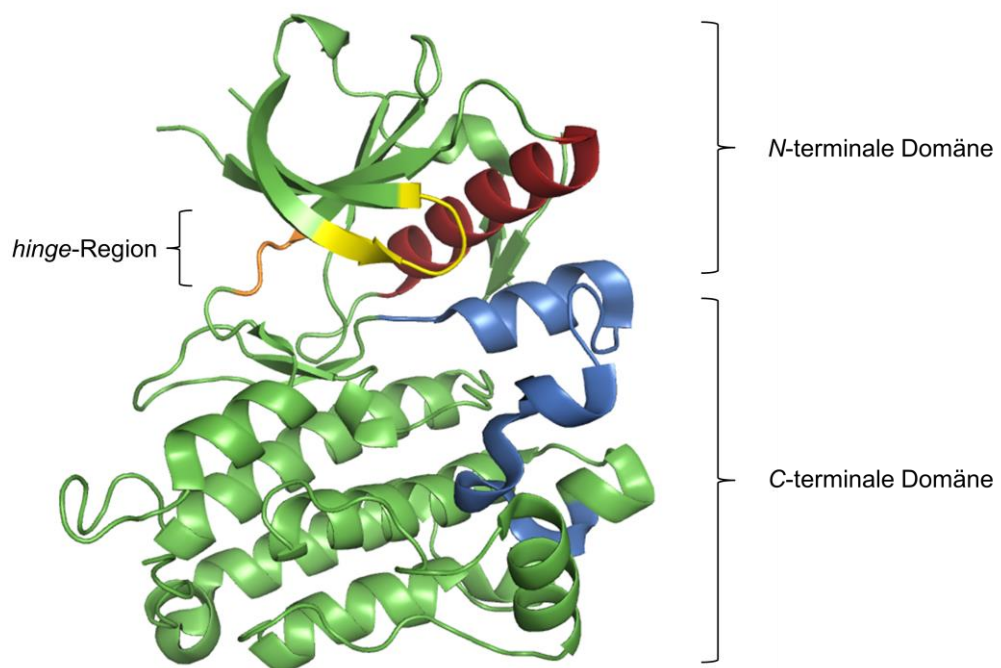


Abbildung 1-1: Ansicht der Proteinkinase-Domäne der ALK (PDB: 4MKC)<sup>33</sup>; orange: *hinge*-Region, gelb: Glycin-reiche Schleife, rot:  $\alpha$ C-Helix, blau: Aktivierungsabschnitt

Die N-terminale Domäne besteht aus fünf antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern und einer regulatorisch wichtigen  $\alpha$ C-Helix. Zwischen dem  $\beta$ 1- und dem  $\beta$ 2-Faltblatt befindet sich eine Glycin-reiche Schleife, welche für die Positionierung der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphatreste des ATPs eine wichtige Rolle spielt (Abbildung 1-1).<sup>22</sup> Weitere wichtige Elemente in diesem Bereich sind das konservierte Lysin (K1150), das sich im  $\beta$ 3-Faltblatt befindet, und das konservierte Glutamat (E1167) in der  $\alpha$ C-Helix



(Abbildung 1-1). Diese beiden Aminosäure bilden eine Salzbrücke aus und sind für die Fixierung des  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphates des ATPs verantwortlich.<sup>34</sup> Die C-terminale Domäne besteht vorwiegend aus  $\alpha$ -Helices. Typischerweise werden in diesem Bereich die Substrate gebunden. Der Aktivierungsabschnitt (*A-segment*) übernimmt wichtige Aufgaben bei der Aktivitätsregulierung der Kinase und wird durch das DFG-Motiv eingeleitet, was bei fast allen anderen Kinasen ebenfalls so ist (Abbildung 1-2). Das DFG-Motiv besteht aus den Aminosäuren Asp-Phe-Gly (Positionen: 1270 – 1272) (Abbildung 1-2). Dabei bindet Asp1270 das  $Mg^{2+}$ -Ion, das wichtigen Einfluss auf die Positionierung der Phosphatreste des ATPs nimmt. Es wird zwischen einem DFG-*in* und einem DFG-*out* Status unterschieden. Im Falle von DFG-*in* befindet sich die Kinase im aktiven Zustand, während die Kinase bei DFG-*out* inaktiv ist. Je nach Zustand der Kinase werden auch ihre Inhibitoren unterschieden. Typ I-Inhibitoren binden an den DFG-*in* Zustand. Typ II-Inhibitoren nutzen die DFG-*out* Konformation der Kinase.<sup>35</sup> Im aktiven Zustand ist das Asp zur ATP-Bindetasche hin orientiert. Im Gegensatz dazu tauschen Asp und Phe im inaktiven Zustand ihre Positionen, wodurch Phe eher zur ATP-Bindetasche hin orientiert ist und Asp von ihr entfernt. Durch die neue Position des Phenylalanins wird eine zusätzliche tiefe Tasche (*allosteric pocket*) im hinteren Bereich der ATP-Bindetasche frei, die vom Typ-II Inhibitor angesprochen wird.<sup>36</sup> Durch Belegen dieser strukturellen Erweiterung ist es möglich selektive Inhibitoren zu entwickeln, da die Ausprägung der DFG-*out* Konformation und dieser zusätzlichen Bindetasche zwischen verschiedenen Kinasen stark differiert. Jedoch sind diese Typ II-Inhibitoren auch anfälliger für Mutationen, die zu einem Aktivitätsverlust führen.<sup>35</sup> Für ALK wurde bislang keine DFG-*out* Konformation beobachtet.<sup>22</sup> Der mittlere Bereich des Aktivierungsabschnittes wird auch als Aktivierungsschleife (*activation loop*) bezeichnet und beherbergt Tyrosinreste, die zur Aktivierung der Kinase phosphoryliert werden. Der Aktivierungsabschnitt endet mit den Aminosäuren Pro-Pro-Glu (Positionen: 1297 – 1299). Die *hinge*-Region stellt das verbindende Element zwischen der C-terminalen und der N-terminalen Domäne dar und ist ein charakteristisches Element der Kinasen. Eingeleitet wird sie durch den *gatekeeper* (*gk*), welcher im Fall der ALK L1196 ist. Die drei nachfolgenden Aminosäuren E1197 (*gk*+1), L1198 (*gk*+2), M1199 (*gk*+3) formen die *hinge*-Region. Dieses Strukturelement bildet wichtige Wasserstoffbrücken mit dem Adeningrundkörper des ATPs aus. Das Ausbilden derartiger Wasserstoffbrücken wird ebenfalls bei ATP-kompetitiven Kinaseinhibitoren

beobachtet. Die Größe des *gatekeepers* hat wichtigen Einfluss auf die Ausgestaltung der Bindetasche. Bei einem kleinen *gatekeeper* wird möglicherweise eine weitere hydrophobe Tasche (*back pocket*) im hinteren Bereich der Bindetasche ausgebildet. Das Belegen dieser Tasche kann der Selektivitätssteigerung dienen.<sup>35</sup> Interaktionen zwischen ALK-Inhibitoren und der ATP-Bindetasche werden in Kapitel 1.5 näher erläutert.

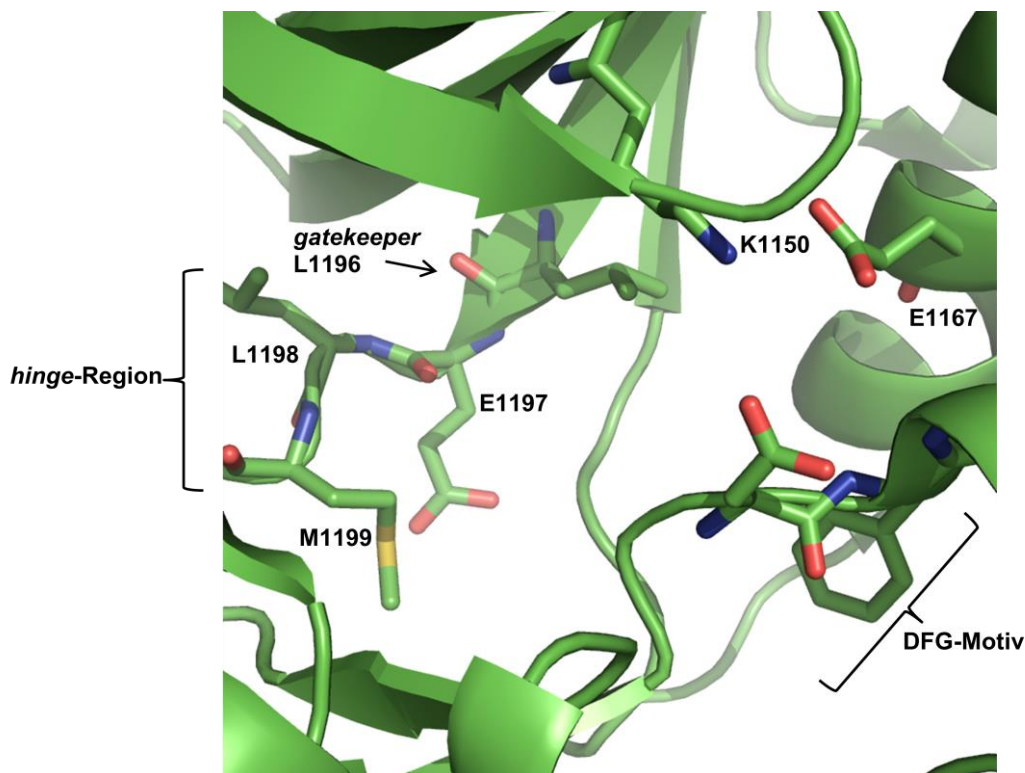


Abbildung 1-2: Ansicht der ATP-Bindetasche der ALK im Detail (PDB: 4MKC)<sup>33</sup>

### 1.3 Resistenzentwicklung

Ein bekanntes Problem bei der Therapie von Krebserkrankungen mit Kinaseinhibitoren ist die Entwicklung von Resistenzen, die die Wirkung der Arzneistoffe vermindern und als erworbene Resistenzen bezeichnet werden. Unter Behandlung von NSCLC-Patienten mit dem ALK-Inhibitor Crizotinib (Kapitel 1.4.1) kommt es im Mittel nach etwa 7 Behandlungsmonaten zur Ausbildung von Resistenzen.<sup>37</sup> Verantwortlich dafür können verschiedene Aspekte sein. Eine mögliche Ursache ist die Ausbildung von Mutationen in der Proteinkinase-Domäne, insbesondere am *gatekeeper*.<sup>38</sup> Dabei werden Aminosäuren ausgetauscht, was

beispielsweise den Bindemodus des Inhibitors durch eine Konformationsänderung oder durch sterische Wechselwirkungen stören kann. Neben einer Veränderung am *gatekeeper* (L1196M) wurden zahlreiche andere Mutationen wie C1156Y, G1269A, F1174L, 1151Tins, L1152R, S1206Y, I1171T, V1180L, D1203N und G1202R beobachtet.<sup>39-42</sup> Abbildung 1-3 zeigt eine Kristallstruktur der ALK, bei der Positionen markiert sind, an denen ein Austausch von Aminosäuren beobachtet wurde. Einige der Mutationen befinden sich nahe der ATP-Bindetasche und bewirken dort möglicherweise eine Konformationsänderung. Das Entstehen einer *gatekeeper*-Mutation ist ein bekanntes Problem und wurde bereits bei anderen Kinaseinhibitoren beobachtet. So tritt unter der Behandlung mit Imatinib eine *gatekeeper*-Mutation (T315I) am Target BCR-ABL und unter Gefitinib eine *gatekeeper*-Mutation (T790M) am Target EGFR auf, die zu Resistenzen führen.<sup>43, 44</sup> Außerdem kann das Ausbilden von Genamplifikationen der ALK oder ihrer Fusionsgene zu einer Resistenzbildung beitragen.<sup>45, 40</sup> Eine weitere Ursache für die verminderte Wirkung des Inhibitors kann das Aktivieren von alternativen Signalwegen unter Einbeziehung von EGFR, KRAS oder cKIT sein. In diesen Fällen ist eine kombinierte Therapie sinnvoll, um die zusätzlichen Signalwege ebenfalls zu blockieren.<sup>40, 46</sup>

Ein zusätzliches Problem, das unter der Behandlung von ALK-positiven NSCLC-Patienten mit Crizotinib beobachtet wurde, ist das Fortschreiten der Krankheit unter Beteiligung des zentralen Nervensystems (ZNS), wobei sich dabei vor allem im ZNS Metastasen ausbilden. Crizotinib ist in diesem Fall wenig wirksam, da die ZNS-Verfügbarkeit sehr gering ist. Pharmakokinetische Eigenschaften führen deshalb in diesem Fall zu einem Scheitern der Therapie.<sup>47-49</sup> Aufgrund der diversen Resistenzmechanismen ist die Entwicklung von neuen ALK-Inhibitoren erforderlich, die auch bei einer Crizotinib-Resistenz wirksam sind. Sowohl Crizotinib als auch neuere Inhibitoren werden in Kapitel 1.4 vorgestellt.

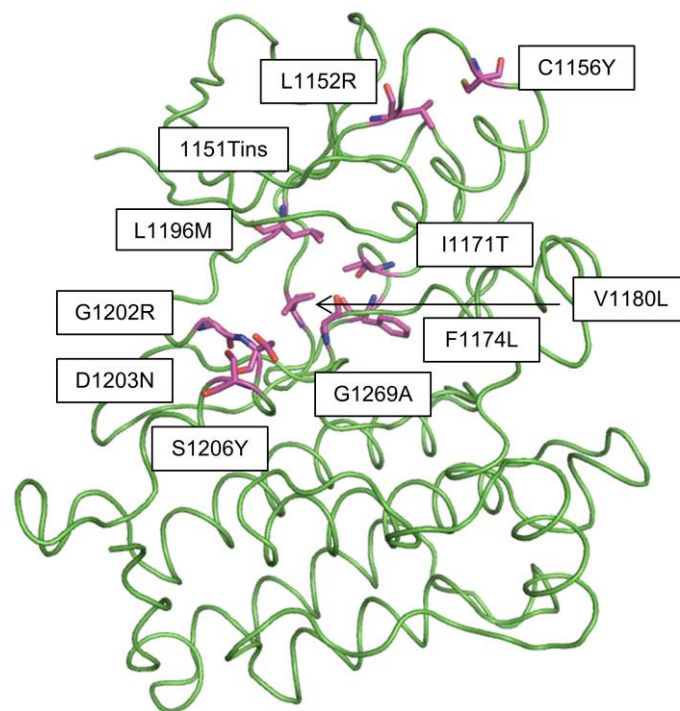


Abbildung 1-3: Lokalisierung der Mutationen bei ALK, die Resistenzen gegen Crizotinib auslösen können (PDB: 4MKC)<sup>33</sup>; Abbildung modifiziert nach Huang *et al.*<sup>50</sup>

### 1.4 Inhibitoren der ALK

Der Werdegang der ALK-Inhibitoren ist durch einen für neue Arzneimittel eher untypisch kurzen Entwicklungsprozess gekennzeichnet. Nur 17 Jahre nach der Entdeckung von NPM-ALK im Zusammenhang mit ALCL und damit dem Finden eines neuen Targets wurde der erste Arzneistoff Crizotinib in einem beschleunigten Verfahren zugelassen. Etwa drei Jahre später folgten zwei *second-generation* Inhibitoren, Ceritinib und Alectinib. Darüber hinaus befinden sich diverse andere Arzneistoffkandidaten in der klinischen Entwicklung. Im Folgenden sollen sowohl zugelassene Inhibitoren als auch einige der in der Entwicklung befindlichen Inhibitoren vorgestellt werden.

### 1.4.1 Crizotinib

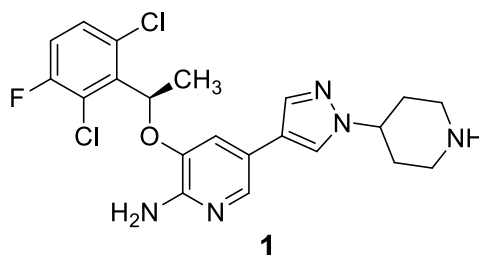


Abbildung 1-4: Crizotinib (**1**)

Crizotinib (PF-02341066, Xalkori®) (**1**) wurde von Pfizer ursprünglich als cMet-Inhibitor entwickelt. Die Optimierung der anfänglichen Struktur erfolgte deshalb in einem *structure-based drug design* (SBDD) in Hinblick auf cMet.<sup>51</sup> Die *off-target* Aktivität an ALK und ROS1 wurde erst im späteren Verlauf der Entwicklung entdeckt. Im Jahre 2011 wurde der Arzneistoff von der FDA in einem beschleunigten Verfahren (*accelerated approval*) zugelassen. Grundlage dafür waren erste, sehr positive Ergebnisse in Hinblick auf Ansprechrates und das progressionsfreie Überleben in Phase I/II einer klinischen Studie mit ALK-positiven NSCLC-Patienten im Vergleich zu einer Chemotherapie.<sup>15, 52</sup> Nach weiteren Studien wurde 2013 dann auch die reguläre Zulassung erteilt. Es handelt sich um eine chirale Verbindung mit einer Aminopyridingrundstruktur, bei der das R-Enantiomer das Eutomer ist, wobei die ALK mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 20 nM inhibiert wird. An cMet ist die Aktivität deutlich ausgeprägter (IC<sub>50</sub>-Wert = 8.0 nM).<sup>51</sup> Auch Zelltests mit einer KARPAS-299 Zelllinie, die NPM-ALK exprimiert, konnten eine antiproliferative Wirkung mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 32 nM zeigen.<sup>53</sup> Selektivitätsuntersuchungen an 120 humanen Kinasen ergaben ein sehr positives Selektivitätsprofil von Crizotinib.<sup>54</sup> In einer Phase III-Studie konnte ein progressionsfreies Überleben (*progression-free survival*, PFS) von 7.7 Monaten und eine objektive Ansprechrates (*objective response rate*, ORR) von 65% gezeigt werden.<sup>55, 37</sup> Problematisch in der Crizotinib-Therapie sind die zuvor beschriebene Ausbildung von Resistenzen und die schlechte ZNS-Verfügbarkeit des Arzneistoffes (Kapitel 1.3). Eine Weiterentwicklung neuer Inhibitoren mit verbessertem pharmakokinetischen und Selektivitätsprofil ist daher erforderlich.

## 1.4.2 PF-06463922

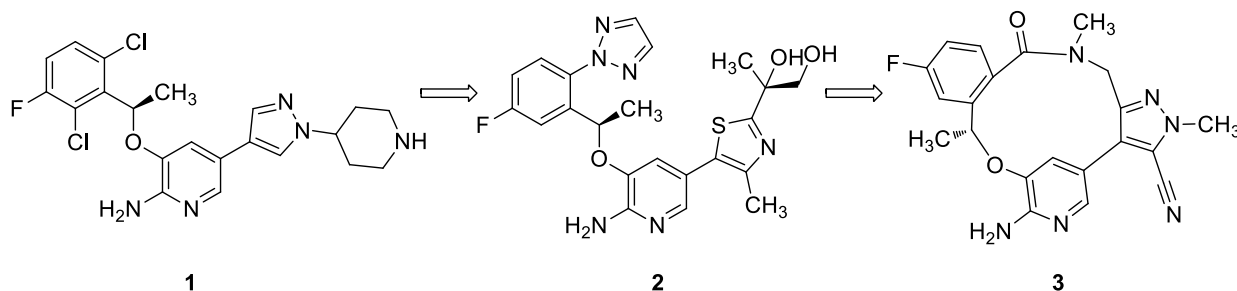


Abbildung 1-5: Entwicklung von PF-06463922 (3): Crizotinib (1), PF-06439015 (2), PF-06463922 (3)

Die Entwicklung des Makrozyklus PF-06463922 (3) erfolgte ausgehend von Crizotinib (1) durch die Firma Pfizer. Ziel war die Verbesserung der Aktivität an Crizotinib-resistenten Mutationen sowie der pharmakokinetischen Eigenschaften. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die ZNS-Verfügbarkeit der Substanzen gelegt. Die schrittweise Optimierung von Crizotinib (1) zu PF-06463922 (3) ist ein Beispiel für ein *structure-based drug design* (SBDD) unter Einbeziehung von medizinisch-chemischen Parametern. Eine erste Optimierungsserie führte HUANG *et al.* zur Verbindung PF-06439015 (2), welche zwar sehr gute Aktivitätsdaten sowohl an der nativen ALK als auch an verschiedenen Mutanten der ALK aufweist, jedoch nur im geringen Maße die Blut-Hirn-Schranke überwindet. Die Inhibitionsdaten wurden mit NIH-3T3-Zellen bestimmt. Während für Crizotinib der  $IC_{50}$ -Wert an ALK bei 80 nM lag, konnte dieser durch PF-06439015 auf 0.8 nM gesenkt werden. Für Zellen mit der *gatekeeper*-Mutation L1196M lagen die entsprechenden Werte bei 843 nM und 6.6 nM.<sup>50, 56</sup> JOHNSON *et al.* führten eine weitere Kampagne zur Strukturoptimierung durch, die letztendlich in PF-06463922 (3) mündete. Der Inhibitor zeichnet sich durch verbesserte Inhibitionswerte an ALK ( $IC_{50}$ -Wert = 1.3 nM) und ALK L1196M ( $IC_{50}$ -Wert = 6.6 nM) aus. Daneben werden auch verschiedene Mutanten der ALK, wie C1156Y, F1174L, G1269A, und ROS1 in ihrer Aktivität gehemmt.<sup>56</sup> Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Experimente deuten auf eine gute ZNS-Verfügbarkeit der Substanz hin, was einen deutlichen Vorteil gegenüber der ebenfalls sehr aktiven Verbindung PF-06439015 (2) ausmacht.<sup>56, 57</sup> PF-06463922 (3) befindet sich zurzeit in der klinischen Entwicklung.<sup>58</sup>

### 1.4.3 Ceritinib

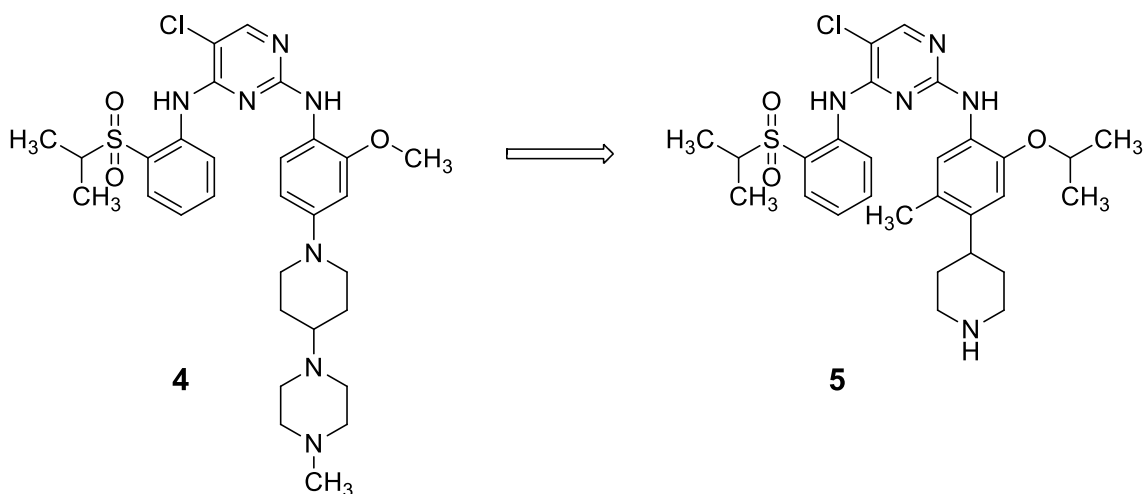


Abbildung 1-6: NVP-TAE-684 (4) und Ceritinib (5)

Ceritinib (LDK378) (Zykadia<sup>®</sup>) (5), entwickelt von Novartis, ist ein ALK-Inhibitor der zweiten Generation, der 2014 von der FDA zur Behandlung von ALK-positivem metastasierenden NSCLC nach vorheriger Crizotinib Behandlung zugelassen wurde. Bereits 2013 wurde für Ceritinib eine *breakthrough designation* durch die FDA vergeben.<sup>59</sup> Abgeleitet wurde der Arzneistoff von NVP-TAE-684 (4). Dieser von GALKIN *et al.* beschriebene Inhibitor zeichnet sich durch eine potente und selektive Hemmung der ALK aus. Basierend auf einem zellulärem *screening* wurde NVP-TAE-684 (4) als potentieller ALK-Inhibitor entdeckt, da eine Ba/F3-NPM-ALK Zelllinie mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 3 nM in ihrem Wachstum inhibiert wurde. Außerdem konnte an verschiedenen ALK-positiven ALCL-Zelllinien eine antiproliferative Wirkung nachgewiesen werden.<sup>60</sup> Jedoch war die weitere klinische Entwicklung des Wirkstoffkandidaten auf Grund der Ausbildung von toxischen Metaboliten nicht möglich. Verantwortlich dafür ist der elektronenreiche Aromat mit der Anilinalpartialstruktur, der zu einer 1,4-Diiminochinon-Partialstruktur oxidiert werden kann, welche Addukte mit Glutathion (GHS) ausbildet.<sup>61</sup> MARSILJE *et al.* beschreiben ausgehend von diesen Ergebnissen ein strukturbasiertes Wirkstoffdesign mit dem Ziel, einen metabolisch stabileren Wirkstoff zu erhalten. Diese Strukturoptimierung führte letztlich zu dem Wirkstoff Ceritinib (5), welcher mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0.2 nM eine hohe Potenz an der ALK aufweist. Beide Inhibitoren (4 und 5) haben als gemeinsame Grundstruktur eine Diaminopyrimidinpartialstruktur. Auch in zellulären

Tests mit Ba/F3-NPM-ALK-Zellen ( $IC_{50}$ -Wert = 26 nM) und KARPAS-299-Zellen ( $IC_{50}$ -Wert = 23 nM) zeichnete sich Ceritinib durch eine antiproliferative Wirkung aus.<sup>61</sup> Des Weiteren wurde an einer Ba/F3-Zelllinie, die verschiedene Formen von EML4-ALK exprimiert, untersucht, inwieweit Crizotinib-resistente Mutanten der ALK inhibiert werden. Neben der *gatekeeper*-Mutante L1196M sind auch G1269A, I1171T und S1206Y sensitiv gegenüber Ceritinib. Jedoch sind Mutanten wie C1156Y, G1202R, 1151Tins, L1152R und F1174C resistent gegen den beschriebenen Wirkstoff **5**.<sup>33</sup> Außerdem wurde ein Kinase-Profil an 30 verschiedenen Kinasen erstellt, bei dem sich zeigte, dass neben der ALK nur IGF-1R, InsR und STK22D im niedrig nanomolaren Bereich inhibiert werden, sodass Ceritinib eine hohe Selektivität erkennen lässt.<sup>61</sup> In einer Phase I-Studie mit NSCLC-Patienten konnte eine *overall response rate* (ORR) von 58% beobachtet werden, wobei das progressionsfreie Überleben (PFS) mit einem Mittel von 7 Monaten angegeben wird.<sup>62</sup> Neuere Studien zeigen zudem, dass Ceritinib eine Wirksamkeit bei NSCLC-Patienten mit Hirnmetastasen hat, was ein weiterer Vorteil gegenüber Crizotinib ist.<sup>63</sup>

#### 1.4.4 Alectinib

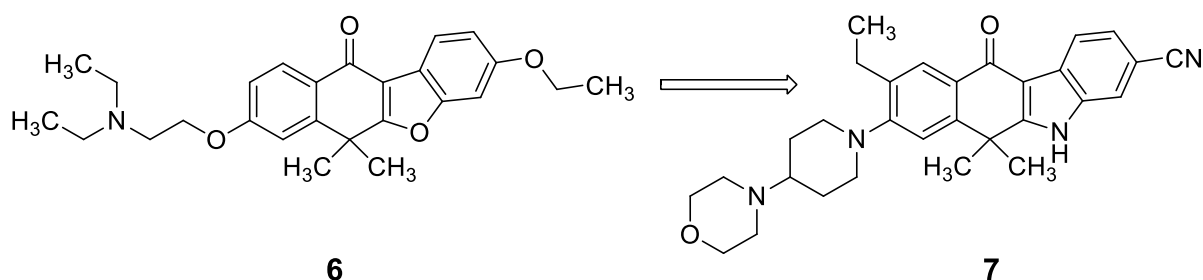


Abbildung 1-7: Hitstruktur **6**, Alectinib (**7**)

Alectinib (CH5424802, RO5424802) (**7**) ist ein ALK-Inhibitor der zweiten Generation, der von der Firma Roche/Chugai entwickelt und 2014 in Japan zugelassen wurde. Bereits 2013 erhielt der Arzneistoff eine *breakthrough designation* der FDA. Grundlage der Entwicklung war ein Hochdurchsatz-Screening, das die Hitstruktur **6** mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 1.3  $\mu$ M an der ALK lieferte.<sup>64</sup> Darauf aufbauend konnte die erhaltene Leitstruktur systematisch zu Alectinib optimiert werden. Der Inhibitor mit



einer Benzo[b]carbazolgrundstruktur zeigt an der ALK einen  $IC_{50}$ -Wert von 1.9 nM.<sup>64</sup> Neben der nativen ALK werden auch verschiedene mutierte Formen, wie L1196M, C1156Y, F1174L, 1151Tins, L1152R und R1275Q, inhibiert. Auch in zellulären Tests an KARPAS-299 (NPM-positive ALCL-Zelllinie;  $IC_{50}$  = 3.0 nM) und NCI-H2228 (EML4-ALK positive NSCLC-Zelllinie;  $IC_{50}$  = 53 nM) zeigte sich eine antiproliferative Wirkung.<sup>65, 66</sup> Alectinib weist zudem eine hohe Selektivität auf, da an 402 getesteten Kinasen neben der ALK nur eine Inhibition an GAK und LTK im niedrigen Konzentrationsbereich auftrat.<sup>66</sup> Des Weiteren konnten verschiedene klinische Studien ein Ansprechen von NSCLC-Patienten auf Alectinib nachweisen.<sup>67</sup> Im Unterschied zu Crizotinib zeigt Alectinib vielversprechende Ergebnisse bei Patienten mit NSCLC-Rückfällen unter ZNS-Beteiligung.<sup>68</sup>

#### 1.4.5 Entrectinib

Bei Entrectinib (RXDX-101, NMS-E628) handelt es sich um einen von Nerviano/Ignyta entwickelten Arzneistoff, der sich derzeit in den klinischen Phasen I/II befindet.<sup>58</sup> Der Arzneistoffkandidat erhielt von der FDA eine *orphan drug designation* für die Behandlung von Neuroblastomen. Neben der ALK werden TrkA, TrkB, TrkC und ROS1 inhibiert. Wie auch bei ALK werden chromosomale Veränderungen von ROS1 im Zusammenhang mit NSCLC gesehen.<sup>69</sup> Außerdem wurde eine Inhibition an den ALK-Mutanten L1196M und C1156Y beobachtet.<sup>70</sup> An NCI-H228-Zellen, einer EML4-ALK exprimierenden NSCLC-Zelllinie, wies Entrectinib auch eine antiproliferative Wirkung auf. Versuche mit Maus-Modellen deuten auf eine Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durch Entrectinib hin.<sup>71</sup>

### 1.4.6 Brigatinib

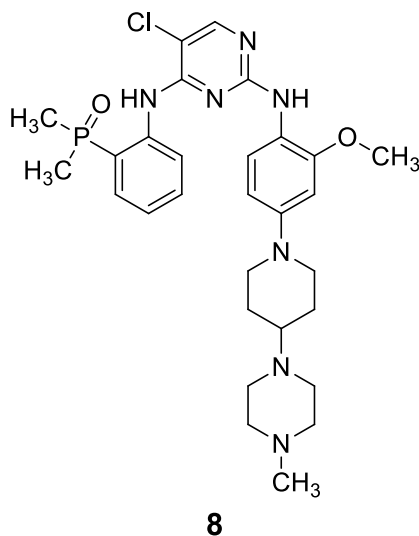


Abbildung 1-8: Brigatinib (8)

Brigatinib (AP26113) (**8**) (Ariad Pharmaceuticals Inc.) ist ein weiterer ALK-Inhibitor, der 2014 von der FDA eine *breakthrough designation* für die Behandlung von ALK-positivem metastasierenden NSCLC mit Crizotinib-Resistenz erhielt. Die Verbindung zeigt hohe strukturelle Ähnlichkeit zu NVP-TAE-684 (**4**) und enthält ebenfalls eine Diaminopyrimidinpartialstruktur.<sup>72</sup> Neben ALK ( $IC_{50}$ -Wert = 0.62 nM) und verschiedenen Mutanten werden ROS1 und EGFR-T790M in ihrer Aktivität inhibiert.<sup>73, 74</sup> An einer EML4-ALK exprimierenden Ba/F3-Zelllinie konnte eine Inhibition mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 10 nM gezeigt werden. Die Zelllinie, die gleichzeitig die L1196M-Mutation trägt, wurde ebenfalls in ihrem Wachstum gehemmt ( $IC_{50}$ -Wert = 24 nM).<sup>41</sup> Bei Patienten mit Hirnmetastasen ergaben sich in der klinischen Phase I/II ebenfalls positive Effekte durch Brigatinib, weshalb sich der Arzneistoff derzeit in der weiteren klinischen Entwicklung befindet.<sup>75, 58</sup>

### 1.4.7 X-396 und X-376

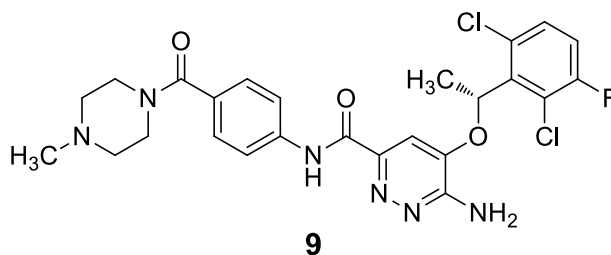


Abbildung 1-9: X-376 (9)

Bei den von Xcovery entwickelten Inhibitoren handelt es sich um Strukturen mit einem Aminopyridazingrundkörper. X-396, dessen Struktur bislang unveröffentlicht ist, zeigt mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $< 0.4$  nM eine deutlich stärkere Aktivität an ALK als Crizotinib. Auch X-376 (**9**) inhibiert ALK im niedrig nanomolaren Bereich ( $IC_{50} = 0.61$  nM).<sup>76</sup> In einem ähnlichen Konzentrationsbereich wird auch cMet inhibiert. Für X-376 liegt der  $IC_{50}$ -Wert an cMet bei 0.69 nM und für X-396 bei 0.74 nM. Im Falle von Crizotinib ist die Aktivität an cMet deutlich stärker ausgeprägt als an der ALK. Desweiteren konnte eine Hemmung von Fusionsproteinen, wie EML4-ALK und NPM-ALK, und von Crizotinib-resistenten Mutanten (L1196M, C1156Y) in verschiedenen Zellassays nachgewiesen werden. Für X-396 lassen sich in den klinischen Phasen I/II außerdem positive Effekte bei Patienten mit Hirnmetastasen erkennen.<sup>77</sup> X-396 befindet sich gegenwärtig in der weiteren klinischen Entwicklung.<sup>58</sup>

### 1.4.8 TSR-011

TSR-011 ist ein von Tesaro entwickelter ALK-Inhibitor, dessen Struktur bislang nicht veröffentlicht wurde. Mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 0.7 nM zeigt die Verbindung eine hohe Aktivität an der ALK. Die Crizotinib-resistente *gatekeeper*-Mutante (L1196M) wird ebenfalls inhibiert ( $IC_{50}$ -Wert: 0.1 nM).<sup>78</sup> Weitere Targets von TSR-011 sind TrkA, TrkB und TrkC, die mit  $IC_{50}$ -Werten zwischen 0.5 – 2.4 nM in ihrer Aktivität gehemmt werden. Außerdem weist die Verbindung an verschiedenen ALK-positiven Zelllinien eine antiproliferative Wirkung auf.<sup>79</sup> Erste Ergebnisse der klinischen Phase ergaben

positive Effekte bei ALK-positiven NSCLC-Patienten.<sup>80</sup> Der Inhibitor befindet sich zurzeit in klinischer Phase I/II.<sup>58</sup>

### 1.4.9 CEP-37440

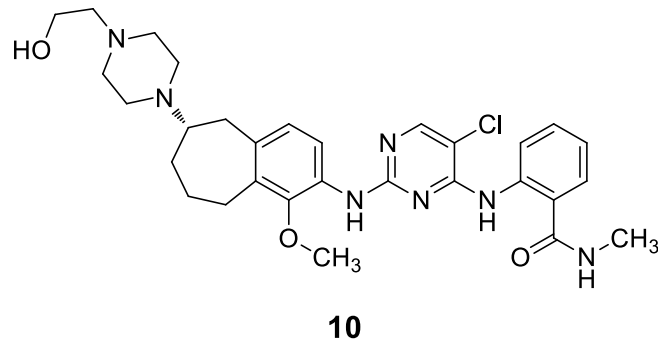


Abbildung 1-10: CEP-37740 (**10**)

Der Arzneistoff CEP-37740 (**10**), welcher eine Diaminopyrimidingrundstruktur aufweist, ist ein dualer Inhibitor von ALK und FAK und wurde von Teva entwickelt. Im enzymatischen Assay wird ALK mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 3.5 nM inhibiert, wobei der  $IC_{50}$ -Wert für FAK bei 2.3 nM liegt. In Mausmodellen konnte ein Rückgang ALK-positiver Tumore beobachtet werden.<sup>81</sup> Derzeit werden weitere klinische Studien zu CEP-37440 durchgeführt.<sup>58</sup>

## 1.5 Bindemodi etablierter ALK-Inhibitoren

Im Laufe der letzten Jahre wurde eine Vielzahl verschiedener Kristallstrukturen der ALK in der *protein data bank* (PDB) veröffentlicht. Darunter befinden sich sowohl Kristallstrukturen der ALK in ihrer nativen Form, als auch solche mit Mutationen, die durch den Austausch bestimmter Aminosäuren entstehen. Im Folgenden sollen einige dieser Strukturen vorgestellt werden. Dabei wird das Protein in der Oberflächendarstellung gezeigt, wobei Kohlenstoffatome in grün, Stickstoffatome in blau und Sauerstoffatome in rot dargestellt sind. Auf die Darstellung von kokristallisiertem Wasser wurde in den meisten Fällen der Übersicht halber verzichtet. Interaktionen in Form von Wasserstoffbrücken sind durch schwarze unterbrochene Linien symbolisiert. Die Inhibitoren und wichtige Aminosäuren sind zudem in Form von Stabmodellen dargestellt.

### Crizotinib

HUANG *et al.* beschreiben den Bindemodus von Crizotinib in der Bindetasche der ALK (Abbildung 1-12). Die beschriebene Pose zeigt zwei Wasserstoffbrücken zwischen dem Inhibitor und der *hinge*-Region. Der Pyridinstickstoff des Inhibitors fungiert als Wasserstoffbrückenakzeptor und bildet eine Wasserstoffbrücke zu der NH-Gruppe des M1199 (*gk+3*), während eine weitere zwischen der primären Aminogruppe von Crizotinib und der Carbonylfunktion des E1197 (*gk+1*) besteht (Abbildung 1-13). Weiterhin wird von HUANG *et al.* beschrieben, dass die Aminogruppe und die Methylgruppe des Liganden zusätzliche Interaktionen zum *gatekeeper* ausbilden. Der halogensubstituierte Ring belegt eine kleine hydrophobe Tasche, die von G1269 und N1254 ausgebildet wird. Die Bindung des zum Fluoratom benachbarten aromatischen Protons wird durch den Elektronenzug des Fluoratoms polarisiert, wodurch eine Wasserstoffbrücke zu der Carbonylfunktion von R1253 möglich wird (Abbildung 1-14). Während die ATP-Bindetasche durch den Liganden besetzt wird, ragt lediglich der Piperidinrest der dem Lösemittel zugewandten Seite zu.<sup>50</sup>

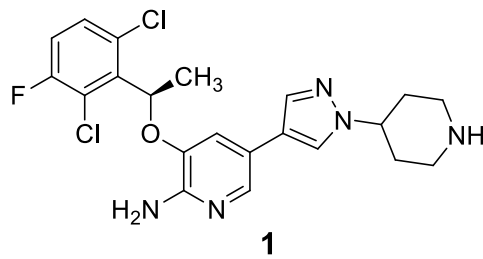


Abbildung 1-11: Crizotinib (**1**)

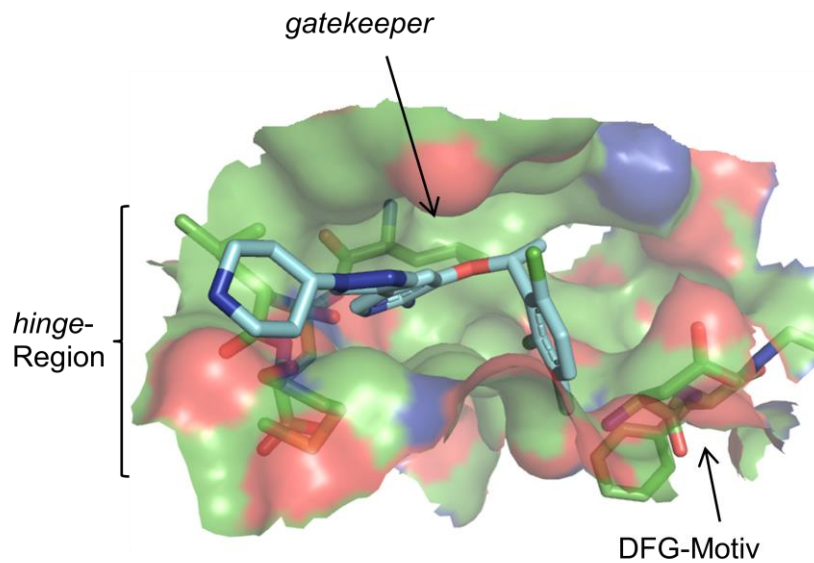


Abbildung 1-12: Crizotinib (**1**) in der Bindetasche der ALK (PDB: 2XP2)<sup>51</sup>

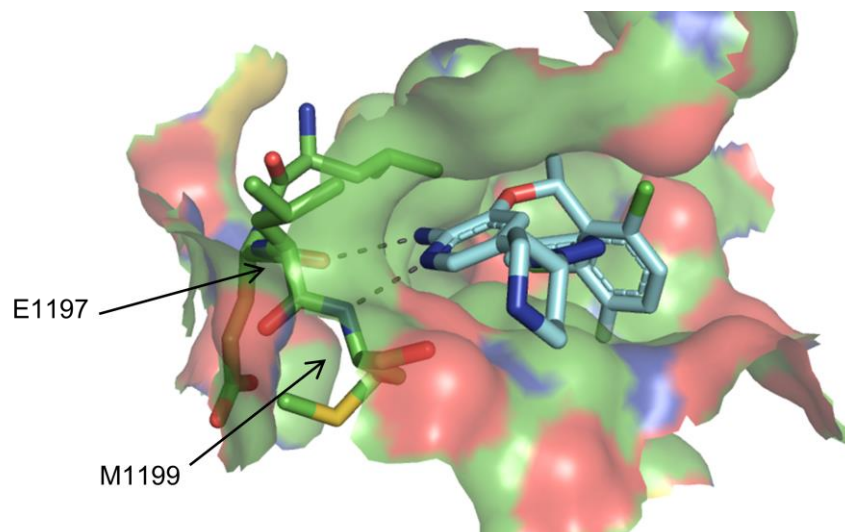


Abbildung 1-13: Crizotinib (**1**) in der Bindetasche der ALK; Interaktion mit der *hinge*-Region im Detail (PDB: 2XP2)<sup>51</sup>

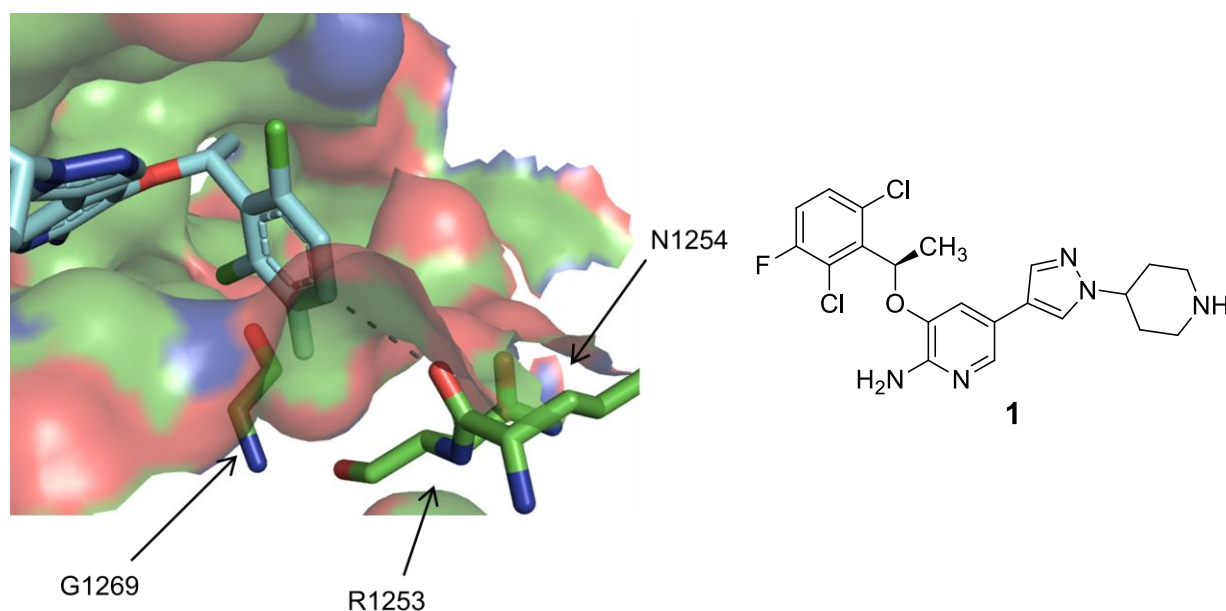


Abbildung 1-14: Crizotinib (1) in der Bindetasche der ALK, Belegung der tiefen Tasche (PDB: 2XP2)<sup>51</sup>

### Alectinib

Eine Kristallstruktur des Inhibitors Alectinib in der ALK wurde von SAKAMOTO *et al.* veröffentlicht. Die Autoren postulieren, dass Alectinib an die DFG-*in* Konformation des Proteins bindet. Der Ligand bildet nur eine Wasserstoffbrücke zur *hinge*-Region aus, wohingegen andere Inhibitoren wie Crizotinib oder Ceritinib zwei Wasserstoffbrücken zur *hinge*-Region ausbilden. Die Carbonylgruppe des Inhibitors fungiert dabei als Wasserstoffbrückenakzeptor und interagiert mit der NH-Gruppe des Met1199 der *hinge*-Region (*gk*+3) (Abbildung 1-16). Weiterhin wird beschrieben, dass von der NH-Gruppe und der Nitrilfunktion des Inhibitors ein Wasserstoffbrückennetzwerk über das kokristallisierte Wasser und das kokristallisierte Ethylenglykol zu benachbarten Aminosäuren ausgebildet wird. In dieses Netzwerk werden die Aminosäuren K1150, E1167, G1269, D1270 und R1253 mit einbezogen (Abbildung 1-15). Die Autoren geben außerdem eine mögliche Interaktion zwischen dem Kohlenstoffatom des Nitrils und dem *gatekeeper* Leu1196 an. Das Nitril belegt eine Tasche im hinteren Bereich der ATP-Bindetasche nahe dem konservierten Glutamat (E1167).<sup>65</sup>

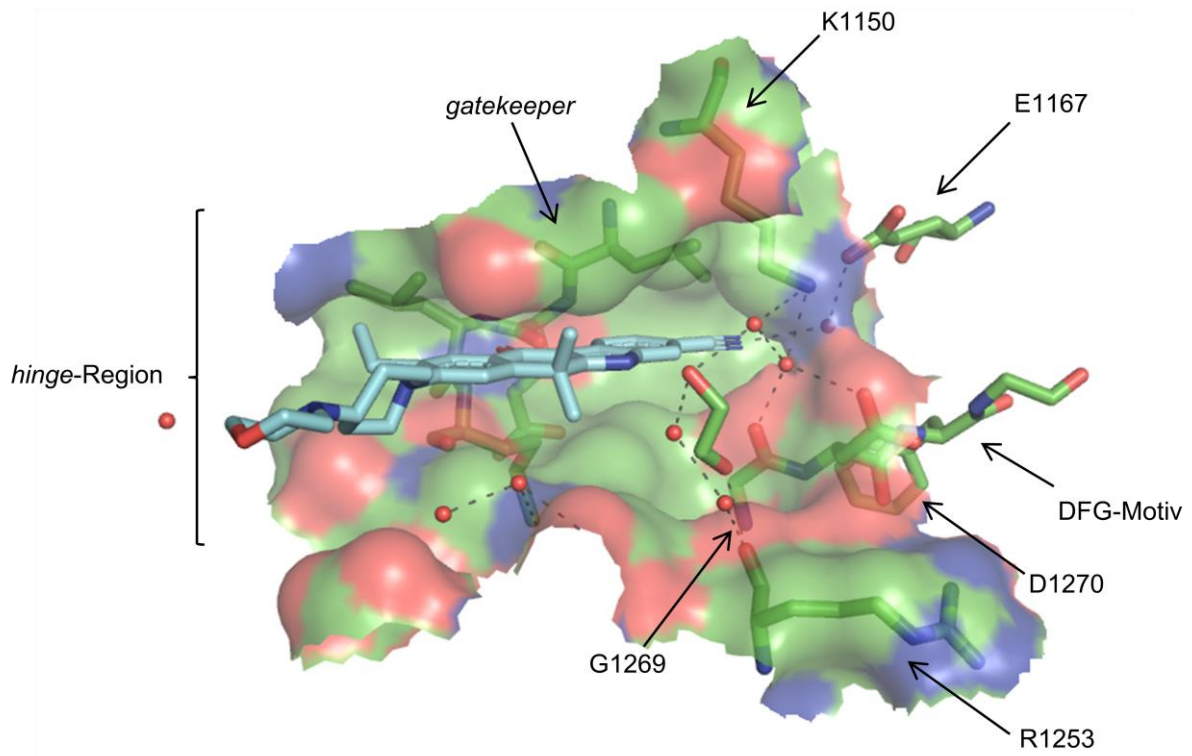


Abbildung 1-15: Alectinib (**7**) in der Bindetasche der ALK (PDB: 3AOX)<sup>65</sup>; Wassermoleküle werden durch rote Kugeln symbolisiert.

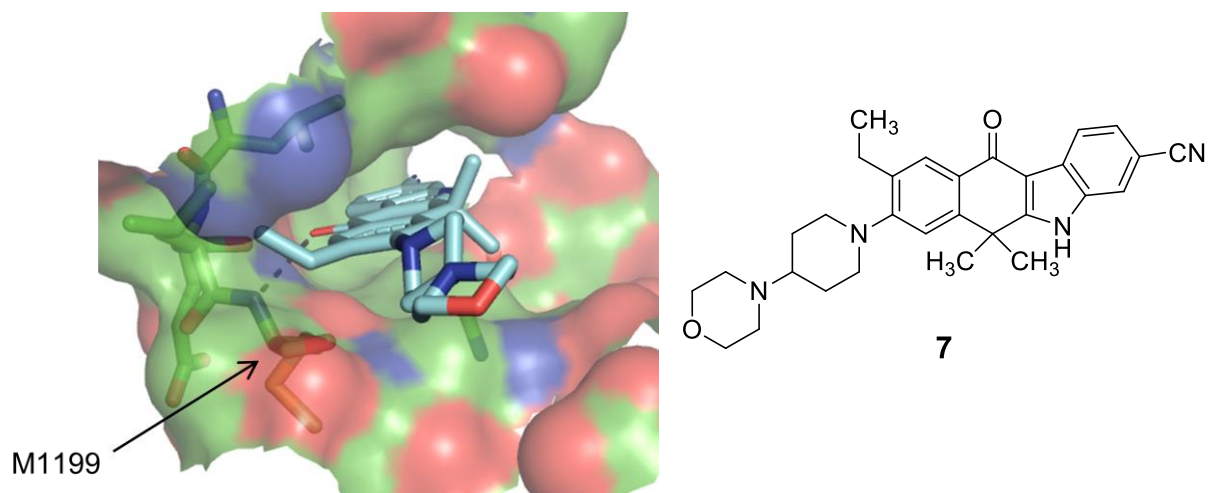


Abbildung 1-16: Alectinib (**7**) in der Bindetasche der ALK; Interaktion mit der *hinge*-Region im Detail (PDB: 3AOX)<sup>65</sup>



## NVP-TAE-684

Bossi *et al.* veröffentlichten eine der ersten Kristallstrukturen der ALK, bei der ein Ligand kokristallisiert ist, sodass diese eine besondere Bedeutung in der Strukturaufklärung der ALK und der Entwicklung neuer Inhibitoren hatte. Diese Kristallstruktur zeigt, dass sowohl vom Pyrimidinstickstoff als auch von der Aminogruppe des Liganden jeweils eine Wasserstoffbrücke zu Met1199 (*gk+3*) der *hinge*-Region ausgebildet wird (Abbildung 1-18). Der Chlorsubstituent ist dem hinteren Bereich der Bindetasche zugewandt. Der aromatische Ring mit dem Sulfon-Substituenten füllt eine Tasche unter der Glycin-reichen Schleife und bildet dort hydrophobe Interaktionen mit Val1130, Gly1123 und His1124 aus. Der aromatische Ring, der den Methoxysubstituenten trägt, liegt zwischen Leu1122 und Gly1202. Die aliphatischen stickstoffhaltigen Ringe ragen zur Lösemittel-zugewandten Seite (Abbildung 1-17).<sup>82</sup>

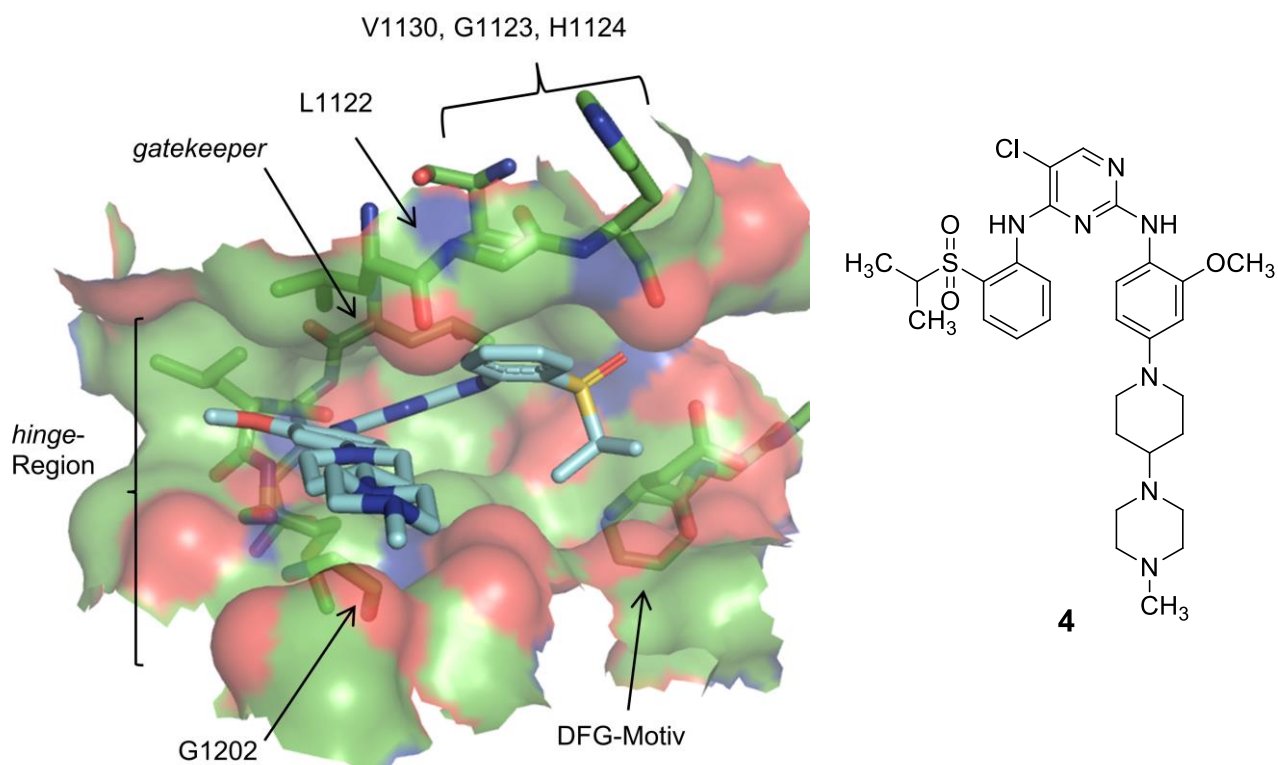


Abbildung 1-17: NVP-TAE-684 (**4**) in der Bindetasche der ALK (PDB: 2XB7)<sup>82</sup>

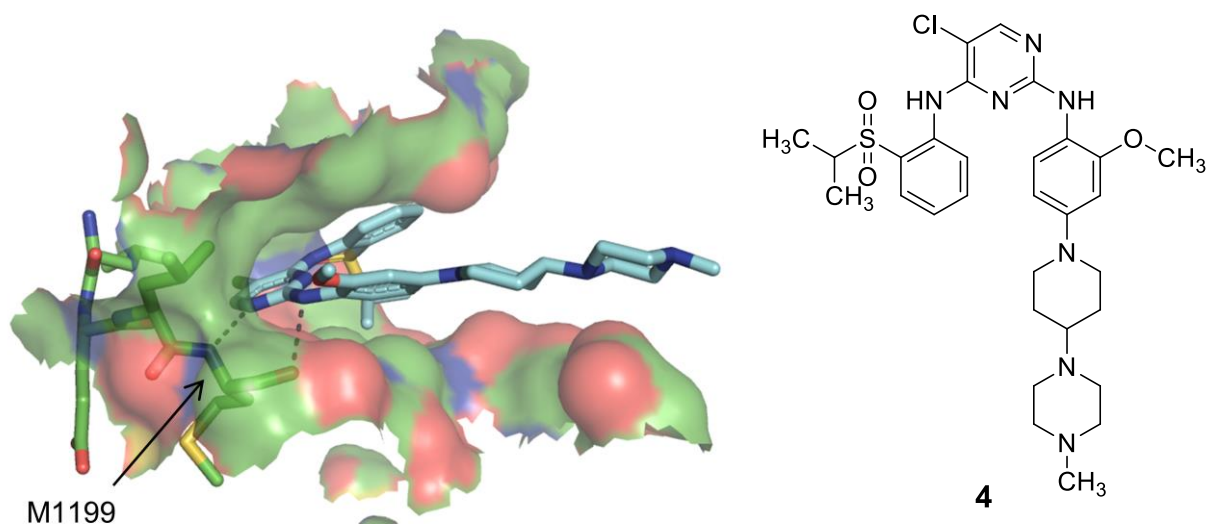


Abbildung 1-18: NVP-TAE-684 (4) in der Bindetasche der ALK; Interaktion mit der *hinge*-Region im Detail (PDB: 2XB7)<sup>82</sup>

### Ceritinib

Der Bindemodus von Ceritinib in der ALK wird von FRIBOULET *et al.* beschrieben. Vergleichbar mit der Vorläufersubstanz NVP-TAE-684 werden auch in diesem Fall durch die gleichen Strukturelemente zwei Wasserstoffbrücken zu Met1199 (*gk*+3) der *hinge*-Region ausgebildet (Abbildung 1-21). Der Chlorsubstituent an der Pyrimidinpartialstruktur bildet hydrophobe Interaktionen mit der Seitenkette des *gatekeepers* L1196 aus. Allgemein lassen sich die Posen von NVP-TAE-684 und Ceritinib in Deckung bringen, was ihrer strukturellen Ähnlichkeit geschuldet ist. Auch hier liegt der aromatische Ring mit dem Sulfon-Substituenten im hinteren Bereich der Bindetasche unterhalb der Glycin-reichen Schleife. Der Piperidinrest im vorderen Bereich der Bindetasche nimmt ebenfalls eine ähnliche Position ein.<sup>33</sup>

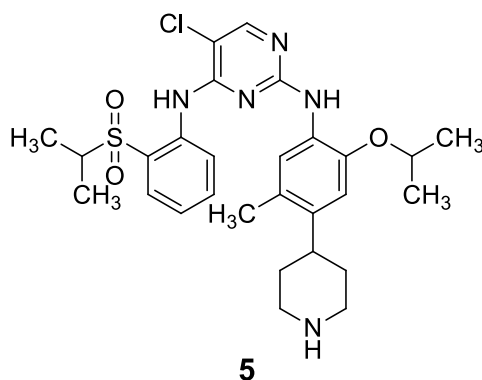


Abbildung 1-19: Ceritinib (5)

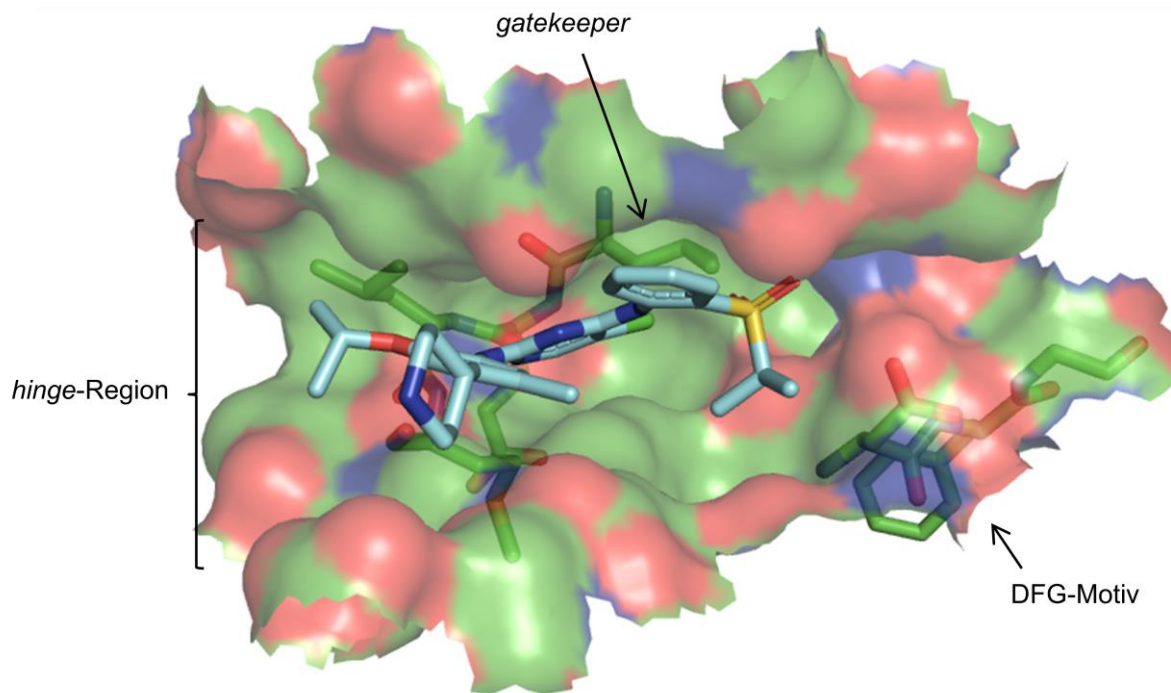


Abbildung 1-20: Ceritinib in der Bindetasche der ALK (PDB: 4MKC)<sup>33</sup>

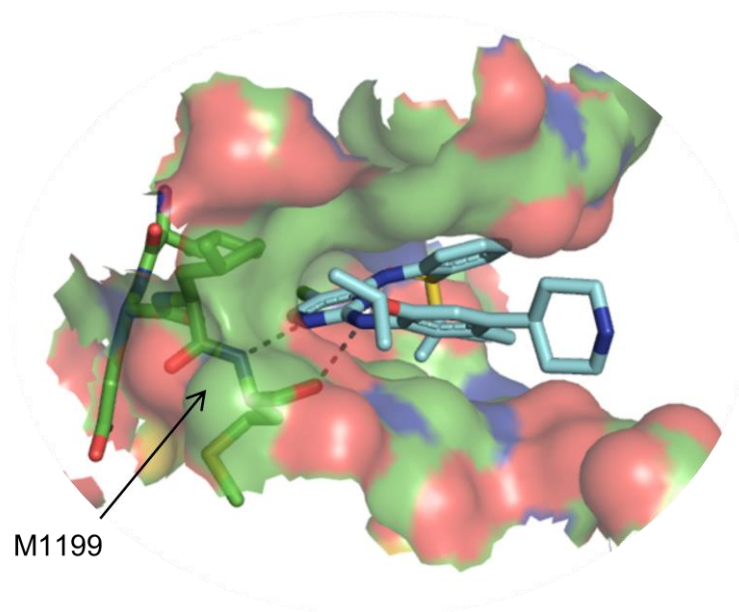


Abbildung 1-21: Ceritinib in der Bindetasche der ALK; Interaktion mit der *hinge*-Region im Detail (PDB: 4MKC)<sup>33</sup>

## 1.6 Aufgabenstellung

Da die ALK mit einer Vielzahl verschiedener Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden kann, jedoch verschiedene Resistenzmechanismen bekannte Wirkstoffe in ihrer Wirkung abschwächen, besteht weiterhin Interesse an der Entwicklung neuer strukturell unabhängiger Inhibitoren. Grundlage dieses Projektes ist die Arbeit von WÖLFEL, welche in Kooperation mit der Firma ProQinase GmbH entstand. Zu Beginn des Projektes wurde ein *high throughput screening* mit einer Substanzbibliothek von 25000 kommerziell erworbenen Verbindungen durchgeführt. Die biologische Testung erfolgte dabei an ALK, AXL und FAK. Aus den daraus resultierenden Ergebnissen wurde die Grundstruktur **11** (Abbildung 1-22) entwickelt, die intensiv von WÖLFEL bearbeitet und variiert wurde. Dabei zeigten die synthetisierten Verbindungen in enzymatischen Tests eine Hemmung der ALK im niedrig mikromolaren Konzentrationsbereich, wobei die potenteste Verbindung einen  $IC_{50}$ -Wert von 650 nM an der ALK aufwies.<sup>83, 84</sup>

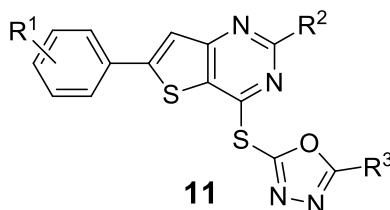


Abbildung 1-22: Grundstruktur **11** der von WÖLFEL bearbeiteten Verbindungsklasse

Ausgehend von den positiven Ergebnissen dieser neuen Verbindungsklasse sollte eine weitere Variation der Grundstruktur **11** erfolgen. Dabei wurde der Austausch des Thienopyrimidins gegen einen Puringrundkörper **12** aus verschiedenen Gründen als sinnvoll erachtet. Zum einen wird dadurch eine weitere Interaktion zur *hinge*-Region der Kinase in Form einer zusätzlichen Wasserstoffbrücke ermöglicht. Zum anderen zeigen die von WÖLFEL synthetisierten Verbindungen eine hohe Lipophilie und damit verbunden eine niedrige Löslichkeit. Das Einführen der zusätzlichen Stickstoffatome sollte die Polarität erhöhen und damit auch die Löslichkeit der Substanzen verbessern. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Derivate einer neuen Verbindungsklasse mit der Grundstruktur **12** synthetisiert und charakterisiert werden (Abbildung 1-23). Die erhaltenen Derivate sollten anschließend durch die Firma

ProQinase GmbH in Hinblick auf ihre Aktivität an der ALK und einigen anderen Kinasen getestet werden. Der darauffolgende Vergleich der Aktivitätsdaten von verschiedenen Verbindungen sollte das Aufstellen von Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR) ermöglichen.

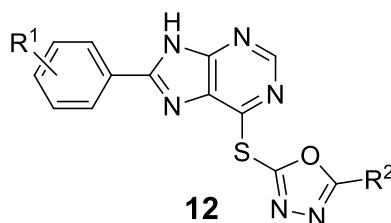


Abbildung 1-23: Purinderivate als neue Grundstruktur **12**

Im weiteren Verlauf sollte die Grundstruktur **12** durch eine Aminogruppe an R<sup>3</sup> zur Grundstruktur **13** erweitert werden, um eine zusätzliche Verbesserung der Löslichkeit zu erreichen (Abbildung 1-24).

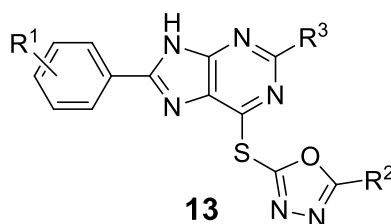


Abbildung 1-24: Erweiterung der Grundstruktur **12** zur Grundstruktur **13**

Vorbereitend für die Synthesen sollten *docking*-Experimente durchgeführt werden. Dabei sollten Hypothesen zu einem möglichen Bindemodus der Substanzklasse aufgestellt und Interaktionen in der ATP-Bindetasche beschrieben werden. Verschiedene Kristallstrukturen der ALK sollten genutzt und die jeweiligen Ergebnisse miteinander verglichen werden. Beobachtungen bei diesen Experimenten sollten zur Auswahl geeigneter Synthesekandidaten führen.

## 2. Molecular docking

### 2.1 Docking tool GOLD

Ein wichtiger Aspekt des strukturbasierten Wirkstoffdesigns sind computergestützte Methoden. In der Wirkstoffentwicklung werden mit Hilfe von *docking*-Programmen potentielle Wirkstoffkandidaten (Liganden) virtuell in die Bindetasche einer Zielstruktur (*target*) eingepasst und dabei Vorhersagen zu möglichen Bindemodi getroffen. Die hierbei beobachteten Interaktionen zwischen Ligand und Protein dienen als Informationsquelle zur Weiterentwicklung des Kandidaten.<sup>85</sup>

*Docking*-Programme lassen sich aufgrund verschiedener Parameter klassifizieren. Ein Aspekt kann die molekulare Flexibilität sein. Dabei wird unterschieden, ob Protein und Ligand starr oder flexibel sind. Beispielsweise arbeitet das Programm DOCK sowohl mit einem starren Liganden als auch mit einem starren Protein.<sup>86</sup> Neuere Programme nutzen im Gegensatz dazu flexible Liganden.<sup>87</sup> Im vorliegenden Fall wurde das Programm GOLD (**G**enetic **O**ptimisation for **L**igand **D**ocking) genutzt, bei dem der Ligand volle azyklische und teilweise zyklische Flexibilität aufweist und das Protein statisch gehalten wird, während jedoch die Umgebung der Bindetasche partiell flexibel ist.<sup>88, 89</sup> Bei *docking*-Experimenten mit GOLD werden verschiedene Posen generiert, wozu das Programm einen genetischen Algorithmus nutzt.<sup>87, 88</sup> Dabei handelt es sich um ein Optimierungsverfahren, das zum Ziel hat, die energetisch günstigste Ausrichtung zu finden. Hierfür wird eine zufällige Menge an Lösungskandidaten erzeugt und nach bestimmten Kriterien werden die besten Kandidaten ausgewählt. Zum Aufstellen einer neuen Menge an Lösungskandidaten werden die Eigenschaften der vorherigen leicht verändert und neu kombiniert. Anschließend werden wiederum die besten Kandidaten ausgewählt und der Prozess mehrmals durchlaufen, bis ein optimales Ergebnis erhalten wird. Somit sind in einem genetischen Algorithmus Ideen und Konzepte aus der biologischen Evolution enthalten.<sup>87, 89</sup> Sogenannte *scoring*-Funktionen (auch *fitness functions* genannt) bewerten die von *docking*-Programmen vorgeschlagenen Bindungsgeometrien auf Grundlage energetischer Parameter.<sup>85</sup> Hier wurde das *chemscore template* von GOLD genutzt. In dieser Funktion wird die Änderung der totalen freien Energie abgeschätzt, die durch Binden eines Liganden entsteht. Dabei werden u.a. Wasserstoffbrückenbindungen, lipophile Interaktionen, Metallwechselwirkungen und

Ligandenflexibilität berücksichtigt. Dieser *scoring*-Funktion liegen empirisch ermittelte Daten zu Grunde.<sup>90, 91</sup> Untergliedert unter dem *chemscore template* findet sich ein *chemscore kinase template*, das speziell für Kinasen entwickelt wurde. Dabei werden zusätzlich schwache CH $\cdots$ O-Interaktionen berücksichtigt.<sup>91</sup> Eine wichtige Voraussetzung für die Erzeugung sinnvoller Ergebnisse beim *docking* von Liganden ist die Existenz von Röntgenkristallstrukturen der als *target* herangezogenen Proteine. Zahlreiche dieser Strukturen sind in der *Protein Data Bank* (PDB) frei abrufbar und können für *docking*-Experimente genutzt werden.<sup>92</sup> Daneben bieten diese auch die Möglichkeit, die Bindetasche des *targets* genauer zu analysieren und Interaktionen mit kokristallisierten Liganden zu untersuchen.

## 2.2 Redocking-Studien

*Redocking* spielt in der Entwicklung, Validierung und Anwendung von *docking*-Programmen eine wichtige Rolle. Dabei wird eine vorhandene Kristallstruktur genutzt, der kokristallisierte Ligand aus der Bindetasche extrahiert und durch erneutes *docking* wieder in diese eingepasst. Anschließend werden die experimentell bestimmte Pose der Kristallstruktur und die vorhergesagte Pose des *dockings* miteinander verglichen und der RMSD-Wert berechnet (*root-mean-square distance*), der ein Maß für die Abweichung ist.<sup>93</sup>

### Redocking Alectinib - 3AOX

Die in Kapitel 1.5 beschriebene Pose von Alectinib in der Bindetasche der ALK konnte von GOLD ohne das Setzen von *constraints* reproduziert werden. Abbildung 2-1 zeigt die Bindetasche der ALK der Kristallstruktur 3AOX. Dabei ist der Originalligand grün und der gedockte Ligand pink dargestellt. Die Wasserstoffbrücke zur *hinge*-Region wurde von GOLD erkannt. Insgesamt ist die Lage der Liganden sehr ähnlich. Dies spiegelt sich auch in dem niedrigen RMSD-Wert von 1.47 Å wieder. Stärkere Abweichungen sind im Lösemittel-zugewandten Bereich zu erkennen, was vermutlich mit der erhöhten Flexibilität des Liganden an dieser Stelle zusammenhängt.



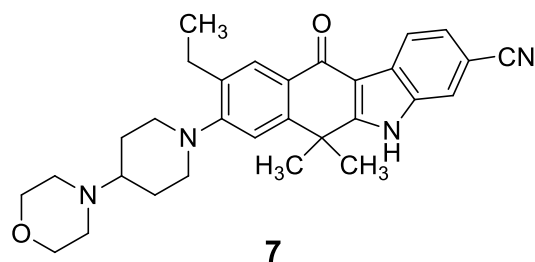
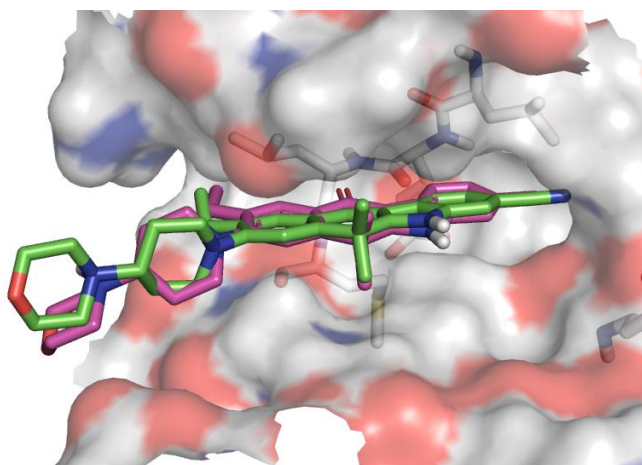


Abbildung 2-1: Redocking von Alectinib (**7**) in die Bindetasche der ALK (PDB: 3AOX); grün: Originalligand, pink: durch *docking* erzeugte Pose

### Redocking Crizotinib - 2XP2

In diesem Fall konnte die Originalpose nicht ohne *constraints* reproduziert werden. Deshalb wurden zwei Wasserstoffbrücken zur *hinge*-Region definiert. Dadurch ergab sich eine ähnliche Pose wie in der Cokristallstruktur 2XP2. Der RMSD-Wert lag hier bei 1.7 Å. Abweichungen sind vor allem in der Position und Orientierung des halogensubstituierten Ringes im hinteren Bereich der Bindetasche zu finden.

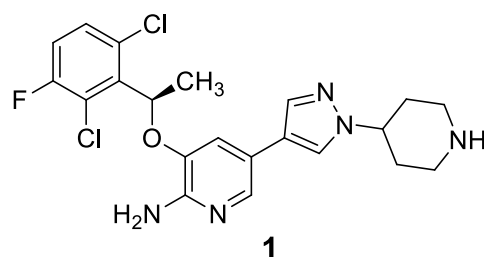
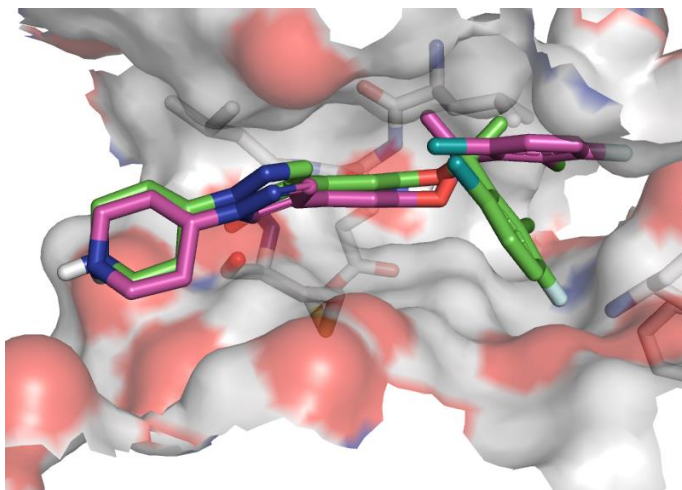


Abbildung 2-2: Redocking von Crizotinib (**1**) in die Bindetasche der ALK (PDB: 2XP2); grün: Originalligand, pink: durch *docking* erzeugte Pose



Redocking Ceritinib - 4MKC

Ohne das Setzen von *constraints* konnte die kokristallisierte Pose nicht reproduziert werden. Daher wurden die in Abbildung 1-21 gezeigten Wasserstoffbrücken zur *hinge*-Region als *constraints* definiert. Die beste erhaltene Pose wies einen RMSD-Wert von 1.9 Å auf und ist in Abbildung 2-3 wiedergegeben. Auch hier zeigen sich vor allem Abweichungen im Lösemittel-zugewandten Bereich.

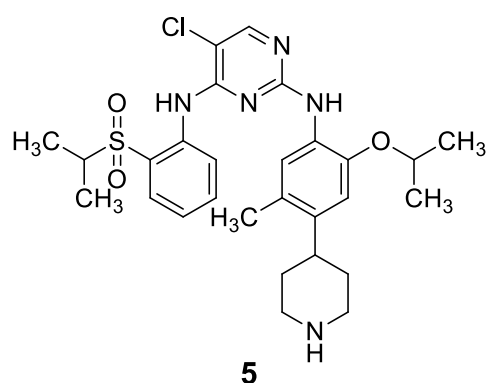
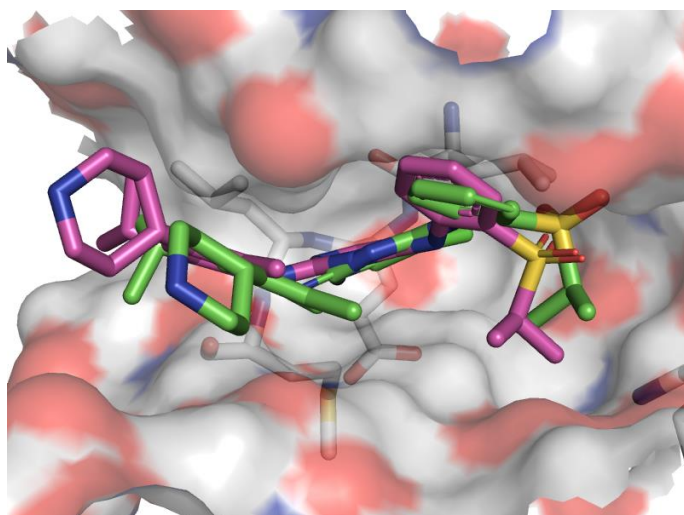


Abbildung 2-3: Redocking von Ceritinib (**5**) in die Bindetasche der ALK (PDB: 4MKC); grün: Originalligand, pink: durch *docking* erzeugte Pose

Redocking von NVP-TAE-684 - 2XB7

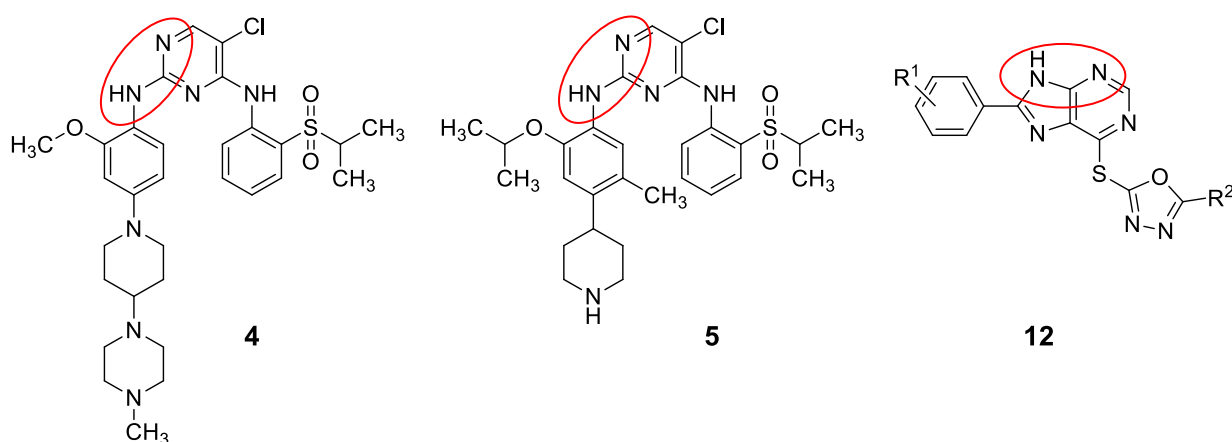
Beim *redocking* der Verbindung NVP-TAE-684 konnte die kokristallisierte Pose trotz *constraints* nicht reproduziert werden, was möglicherweise mit der hohen Flexibilität des Moleküls zu begründen ist.

Insgesamt lässt sich sagen, dass das *redocking* mit GOLD bei starren Molekülen eine gute Reproduzierbarkeit der Originalpose liefert. Bei flexibleren Liganden ist es durch das Setzen von *constraints* in den meisten Fällen ebenfalls möglich, die kristallisierte Pose zu reproduzieren. Deshalb ist es auch sinnvoll, beim Docken mit Liganden, die eine hohe Flexibilität aufweisen, ebenso *constraints* zu definieren.

## 2.3 Docking der Testverbindungen

Zur Bewertung der Ergebnisse der *docking*-Experimente wurden Beobachtungen aus den vorhandenen Kristallstrukturen der ALK herangezogen. Dazu dienten vor allem die Bindemodi der etablierten ALK-Inhibitoren (Kapitel 1.5). Außerdem wurden weitere Kristallstrukturen der ALK, die hier nicht weiter beschrieben sind, betrachtet. Ergänzend dazu wurden exemplarisch verschiedene Kinaseinhibitoren in Hinblick auf ihren Bindemodus in anderen Kinasen untersucht. Bei derartigen Betrachtungen fällt auf, dass sich gewisse Strukturmerkmale innerhalb der Klasse der Kinaseinhibitoren wiederholen. Alle betrachteten Inhibitoren bilden mindestens eine Interaktion zur *hinge*-Region in Form einer Wasserstoffbrücke aus.

Aufgrund der hohen Flexibilität der Zielverbindungen **12**, verursacht durch mehrere rotierbare Einfachbindungen, ergaben *docking*-Experimente an ALK-Kristallstrukturen ohne weitere Vorgaben keine sinnvollen Ergebnisse. Daher wurde auf Grundlage der oben beschriebenen Beobachtungen die Überlegung aufgestellt, dass zwischen Ligand und *hinge*-Region des Proteins Wasserstoffbrücken ausgebildet werden. Durch Auftreten ähnlicher Strukturelemente wie bei Ceritinib und NVP-TAE-684 lässt sich auch für die Zielstrukturen **12** vermuten, dass sie zwei Wasserstoffbrücken zu Met1199 (*gk*+3) bilden. Dabei soll die NH-Gruppe des Puringrundkörpers als Wasserstoffbrückendonator und das Stickstoffatom N(3) als Akzeptor fungieren (Abbildung 2-4).



**Abbildung 2-4:** Vergleich der Strukturmerkmale von NVP-TAE-684 (**4**), Ceritinib (**5**) und der angestrebten Grundstruktur **12**

### 2.3.1 Docking in verschiedene Kristallstrukturen der ALK

Die Ergebnisse der *docking*-Experimente werden zunächst anhand der Beispielsubstanz **12a** erläutert. Verbindung **12a** wurde in die vier Kristallstrukturen der ALK gedockt, die bereits in Kapitel 1.5 beschrieben wurden. Die erhaltenen Posen wurden dann miteinander verglichen, um einen grundsätzlichen Eindruck von der Lage des Liganden in der Bindetasche und von Interaktionsmöglichkeiten zu erhalten. Posen, die keine Interaktionen zur *hinge*-Region ausbilden oder die ATP-Bindetasche nicht befriedigend ausfüllen, wurden als unwahrscheinlich eingeschätzt und werden hier nicht weiter beschrieben. Den einzelnen Kristallstrukturen sind in dem folgenden Abschnitt definierte Farben der durch Kohlenwasserstoff-Teilstrukturen hervorgerufenen Oberflächen zugeordnet. Die Kristallstruktur 4MKC wird hier grau, 2XP2 rot, 2XB7 blau und 3AOX grün dargestellt. Die ATP-Bindetasche ist als Oberfläche visualisiert, wobei die Aminosäuren der *hinge*-Region und des DFG-Motivs in Stäbchenform dargestellt werden. Schwarze unterbrochene Linien zeigen Wasserstoffbrückenbindungen oder gemessene Winkel an. Die Winkelmessungen und die Abstandmessungen der Interaktionen erfolgten mithilfe von PyMOL.<sup>94</sup>

Zunächst werden am Beispiel der Kristallstruktur 4MKC die Ergebnisse der *docking*-Versuche dargestellt. GOLD generierte verschiedene Posen, von denen hier eine gezeigt wird (Abbildung 2-5). Wie in der Darstellung A zu erkennen, ist die Purinpartialstruktur zur *hinge*-Region gerichtet. Aufgrund der hohen Flexibilität des Moleküls wurden zwei *constraints* definiert, da ohne diese keine sinnvollen Posen erhalten wurden. In Darstellung B ist ersichtlich, dass zwei Wasserstoffbrücken vom Puringrundkörper zum Met1199 (*gk+3*) der *hinge*-Region ausgebildet werden. Die Längen dieser Bindungen betragen, gemessen jeweils zwischen den schweren Atomen, von der NH-Gruppe des Met1199 zu dem Stickstoffatom des Liganden 2.7 Å und von der Carbonylfunktion zur NH-Gruppe des Purins 2.7 Å. Diese Längen liegen damit in dem für Wasserstoffbrücken typischen Rahmen.<sup>95</sup> Die Winkel dieser Interaktionen messen 151° und 153°. Auch diese Werte erfüllen Anforderungen für Wasserstoffbrücken, denn laut DESIRAJU wird eine starke Interaktion bei einem Winkel von 180° beobachtet. Mindestens sollte jedoch ein Winkel von 110° erreicht werden.<sup>96</sup> Der Bindungswinkel des Thioethers beträgt hier 100°, wodurch die

Oxadiazolpartialstruktur den mittleren Bereich der Bindetasche belegt. Experimentell bestimmte Winkel von aliphatischen oder aromatischen Thioethern liegen in einem ähnlichen Bereich.<sup>97, 98</sup> Der *p*-Chlorphenylrest befindet sich im hinteren Teil der Bindetasche. Der *p*-Methoxyphenylsubstituent des Purins ragt währenddessen der Lösemittel-zugewandten Seite zu. Darstellung C zeigt den Liganden **12a** mit zusätzlicher Darstellung der Oberfläche. Dies lässt erkennen, dass der Ligand die Bindetasche gut ausfüllt.

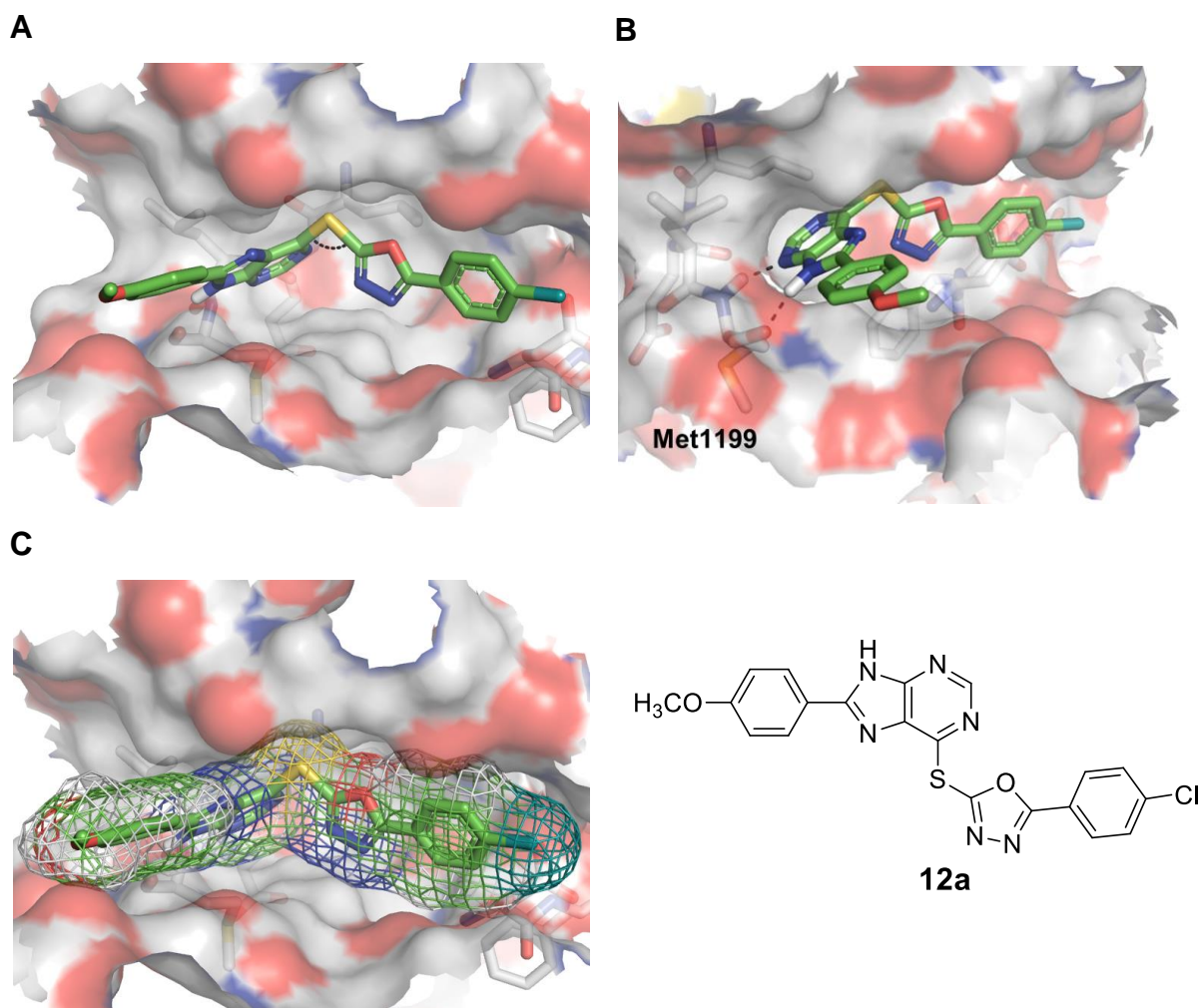
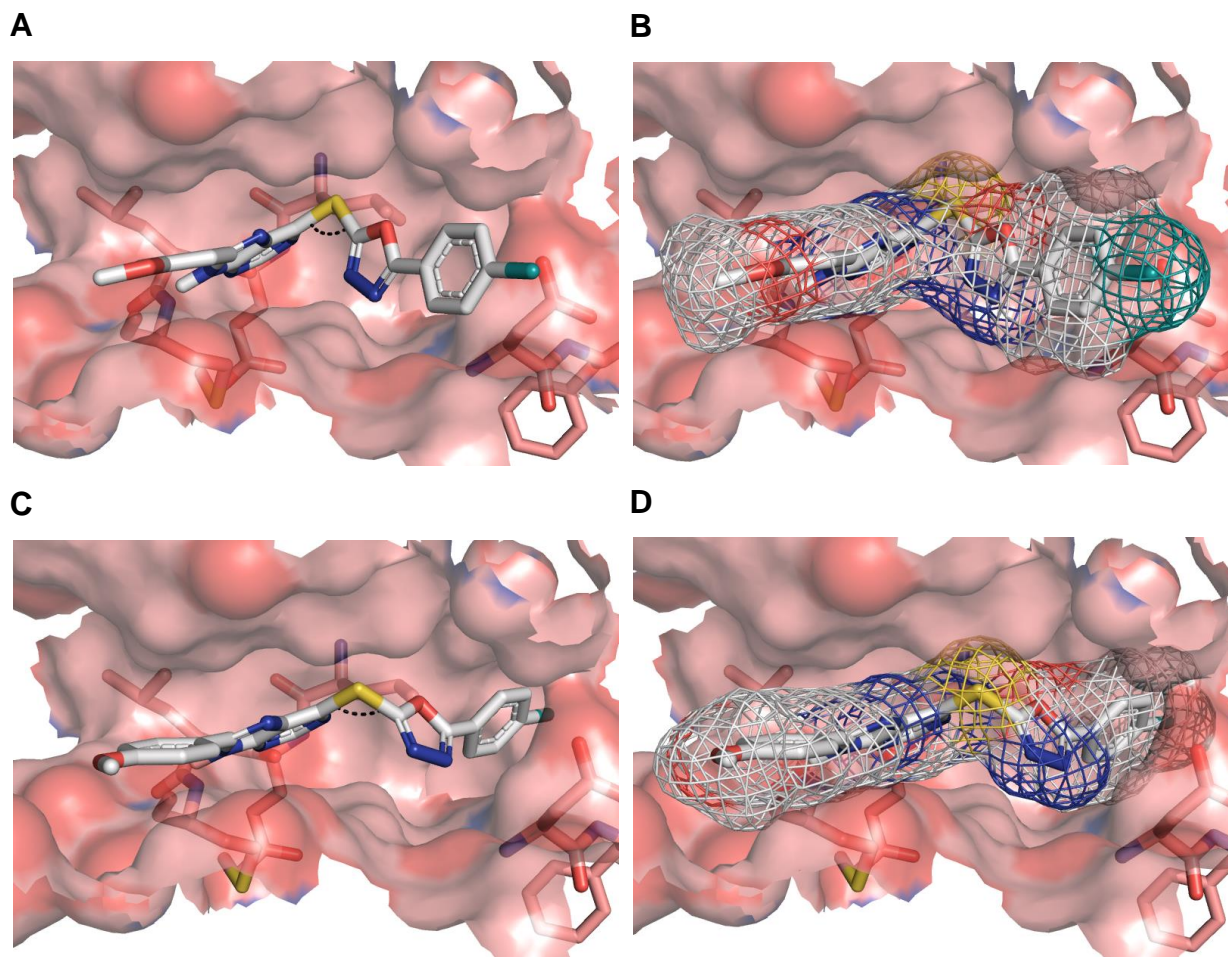


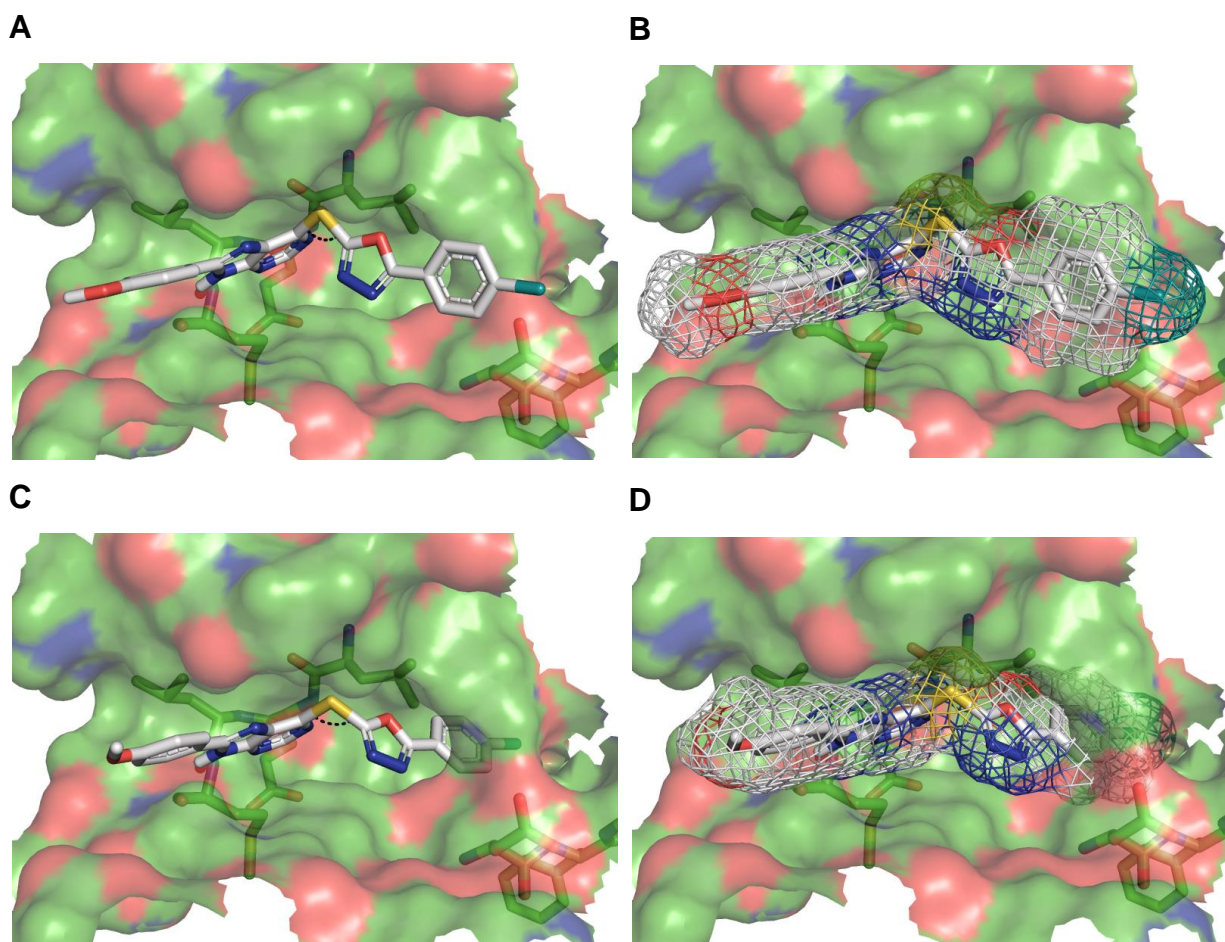
Abbildung 2-5: Docking der Verbindung **12a** in die Kristallstruktur 4MKC der ALK

Weiterhin wurde die Beispielsubstanz **12a** in die Kristallstrukturen 2XP2 (rot), 2XB7 (blau) und 3AOX (grün) gedockt (Abbildung 2-6 – Abbildung 2-8) und die erhaltenen *docking*-Posen miteinander verglichen.

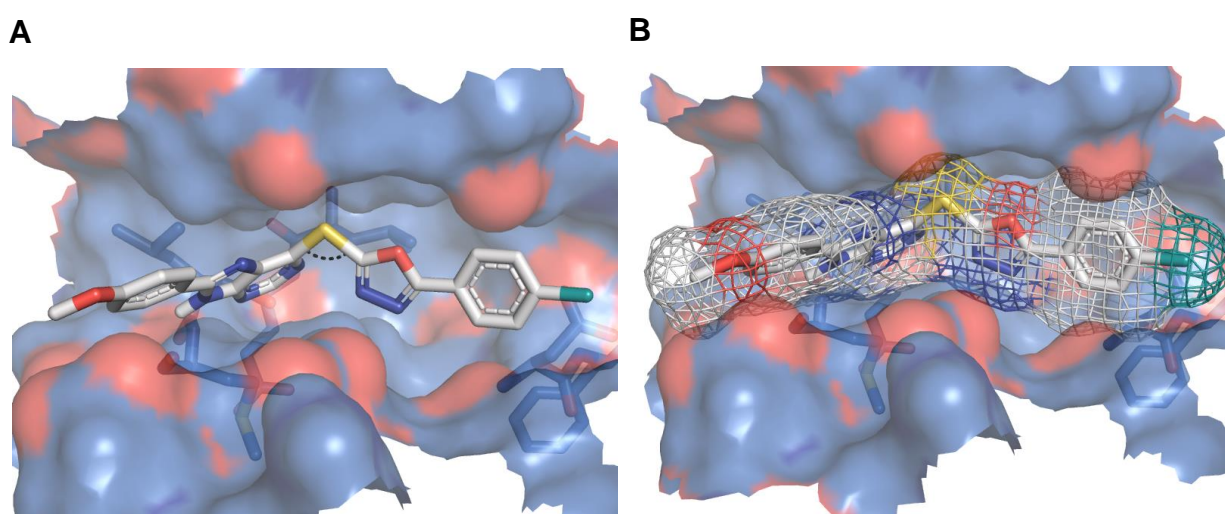


**Abbildung 2-6:** *Docking*-Posen von Verbindung **12a** in der ALK-Kristallstruktur 2XP2; **A,B:** Pose 1, Bindungsabstände und -winkel: Met1199 NH $\cdots$ N3 Purin: 2.7 Å, 159°; Met1199 O $\cdots$ NH Purin: 3.1 Å, 167° **C,D:** Pose 2, Bindungsabstände und -winkel: Met1199 NH $\cdots$ N3 Purin: 3.1 Å, 165°; Met1199 O $\cdots$ NH Purin: 2.6 Å, 154°.





**Abbildung 2-7:** Docking-Posen von Verbindung **12a** in der ALK-Kristallstruktur 3AOX; **A,B:** Pose 1, Bindungsabstände und -winkel: Met1199 NH $\cdots$ N3 Purin: 2.9 Å, 148°; Met1199 O $\cdots$ NH Purin: 2.9 Å, 154° **C,D:** Pose 2, Bindungsabstände und -winkel: Met1199 NH $\cdots$ N3 Purin: 2.6 Å, 142°; Met1199 O $\cdots$ NH Purin: 2.9 Å, 145°.

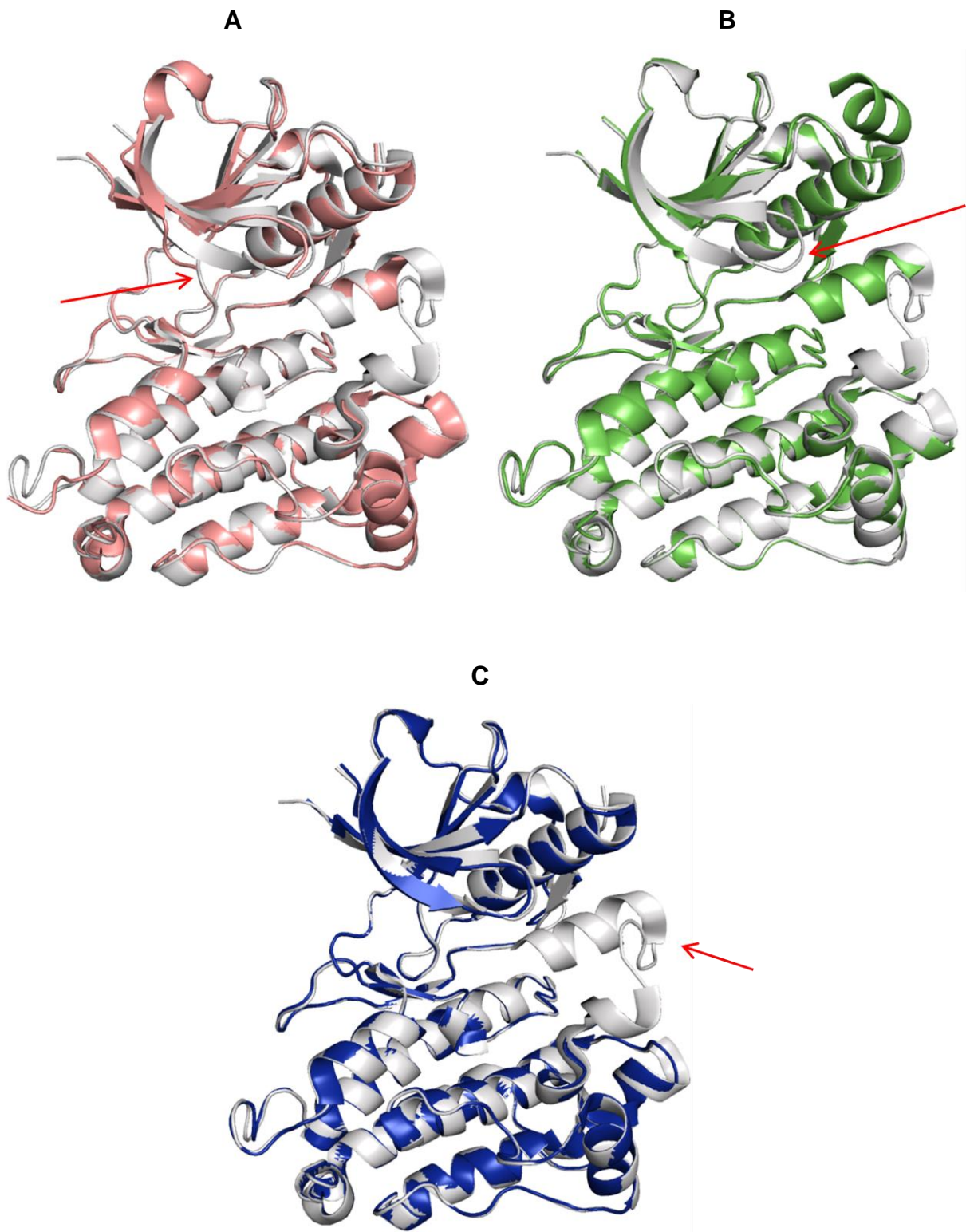


**Abbildung 2-8:** Docking-Pose von Verbindung **12a** in der ALK-Kristallstruktur 2XB7; Bindungsabstände und -winkel: Met1199 NH $\cdots$ N3 Purin: 2.8 Å, 140°; Met1199 O $\cdots$ NH Purin: 2.7 Å, 138°.

Bei dem Vergleich der Posen in den verschiedenen Kristallstrukturen fällt auf, dass die Position des Liganden in allen Fällen sehr ähnlich ist. Bei jedem *docking*-Experiment wurden zwei *constraints* definiert, sodass Interaktionen zur *hinge*-Region ausgebildet werden. Damit ist allen Posen gemein, dass die Purinpartialstruktur zur *hinge*-Region ausgerichtet ist. Es werden die gleichen Wasserstoffbrücken zu Met1199 ausgebildet, die bereits beim Docken in die Kristallstruktur 4MKC (Abbildung 2-5) gezeigt werden konnten. Diese Interaktionen werden hier nicht im Detail dargestellt. In allen Fällen fungiert die NH-Gruppe des Met1199 als Wasserstoffbrückendonator gegenüber dem Stickstoffatom N(3) des Liganden, während die Carbonylfunktion des Met1199 ein Wasserstoffbrückenakzeptor gegenüber der N(9)H-Gruppe des Liganden ist. Die Längen dieser Interaktionen und die Bindungswinkel unterscheiden sich; die jeweiligen Werte sind bei den Abbildungen wiedergegeben. Die Lage des *p*-Methoxyphenylsubstituenten an der Purinpartialstruktur ist in allen Fällen vergleichbar, wobei dieses Strukturelement dem Lösemittel zugewandt ist. Auch der Winkel des Thioethers beträgt in allen Fällen 100°, wodurch die Oxadiazolpartialstruktur in den mittleren Bereich der Bindetasche positioniert wird. Unterschiede finden sich in der Lage des *p*-Chlorphenylsubstituenten. Dieser wird in den hinteren Bereich der Bindetasche verortet. Sowohl bei der Kristallstruktur 2XP2 als auch bei den Strukturen 2XB7 und 3AOX finden sich vergleichbare Positionierungen zu dem *docking*-Experiment mit der Kristallstruktur 4MKC wieder. Dabei füllt der halogensubstituierte aromatische Ring den hinteren Bereich der Bindetasche aus (Abbildung 2-6, Abbildung 2-7, Abbildung 2-8, Oberflächendarstellungen). Beim *docking* in die Kristallstrukturen 2XP2 und 3AOX konnte eine weitere Pose beobachtet werden konnte, die eine abweichende Orientierung des *p*-Chlorphenylsubstituenten zeigt (2XP2 - Pose 2, Abbildung 2-6, Darstellung C, D und 3AOX - Pose 2, Abbildung 2-7, Darstellung C, D). Dieser füllt eine zusätzliche tiefe Kavität im hinteren Bereich der Bindetasche aus, wobei es allerdings zu einem sterischen Konflikt zwischen der Proteinoberfläche und dem *p*-Chlorphenylsubstituenten kommt. Eine derartige Pose konnte bei den Kristallstrukturen 2XB7 und 4MKC nicht beobachtet werden.

Insgesamt betrachtet sind die Orientierungen in der Bindetasche bei allen vier Kristallstrukturen vergleichbar. Posen, wie sie im Falle von 2XB7 oder 4MKC vorkommen, dominieren, da sie in *docking*-Experimenten mit allen vier Kristallstrukturen in ähnlicher Weise wieder gefunden werden konnten. Damit erscheint diese Pose am wahrscheinlichsten. Anschließend wurden die jeweiligen Kristallstrukturen in ihrer Struktur verglichen und auf Unterschiede untersucht (Abbildung 2-9). Dabei zeigten sich einige Auffälligkeiten. Die Unterschiede befinden sich vor allem in der Glycin-reichen Schleife. Bei den Kristallstrukturen 3AOX und 2XP2 konnten in diesem Bereich einige Aminosäuren nicht experimentell bestimmt werden, sodass es hier zu Lücken in der Aminosäuresequenz kommt (Abbildung 2-9, Darstellung A und B). Möglicherweise hat dies Einfluss auf die Ausgestaltung der tiefen Tasche im hinteren Bereich der Bindetasche. Dadurch könnte eventuell das Auftreten der zusätzlichen Pose des Liganden (**12a**) in den Kristallstrukturen 3AOX und 2XP2 begründet sein. Beim Vergleich der Kristallstrukturen 2XB7 und 4MKC ist die Ausgestaltung der Glycin-reichen Schleife sehr ähnlich. Jedoch finden sich hier Unterschiede im Bereich der Aktivierungsschleife. In der Kristallstruktur 2XB7 sind in diesem Bereich einige Aminosäuren nicht kristallographisch definiert (Abbildung 2-9, Bild C). Für weitere *docking*-Experimente wurde daher die Kristallstruktur 4MKC ausgewählt.





**Abbildung 2-9:** **A:** Vergleich 4MKC (grau) und 2XP2 (rot); **B:** Vergleich 4MKC (grau) und 3AOX (grün); **C:** Vergleich 4MKC (grau) und 2XB7 (blau)

### 2.3.2 Variation am Puringrundkörper

Der Puringrundkörper der Grundstruktur **12** bietet verschiedene Variationsmöglichkeiten, die durch *docking*-Experimente näher betrachtet wurden. Um die Relevanz der beschriebenen Wasserstoffbrücken zu bestätigen, wurde untersucht, inwieweit eine Ethylierung des Stickstoffatoms an Position 9 zu einer Störung des Bindemodus führt. Dazu wurde Verbindung **14** in die Kristallstruktur 4MKC der ALK gedockt (Abbildung 2-10).

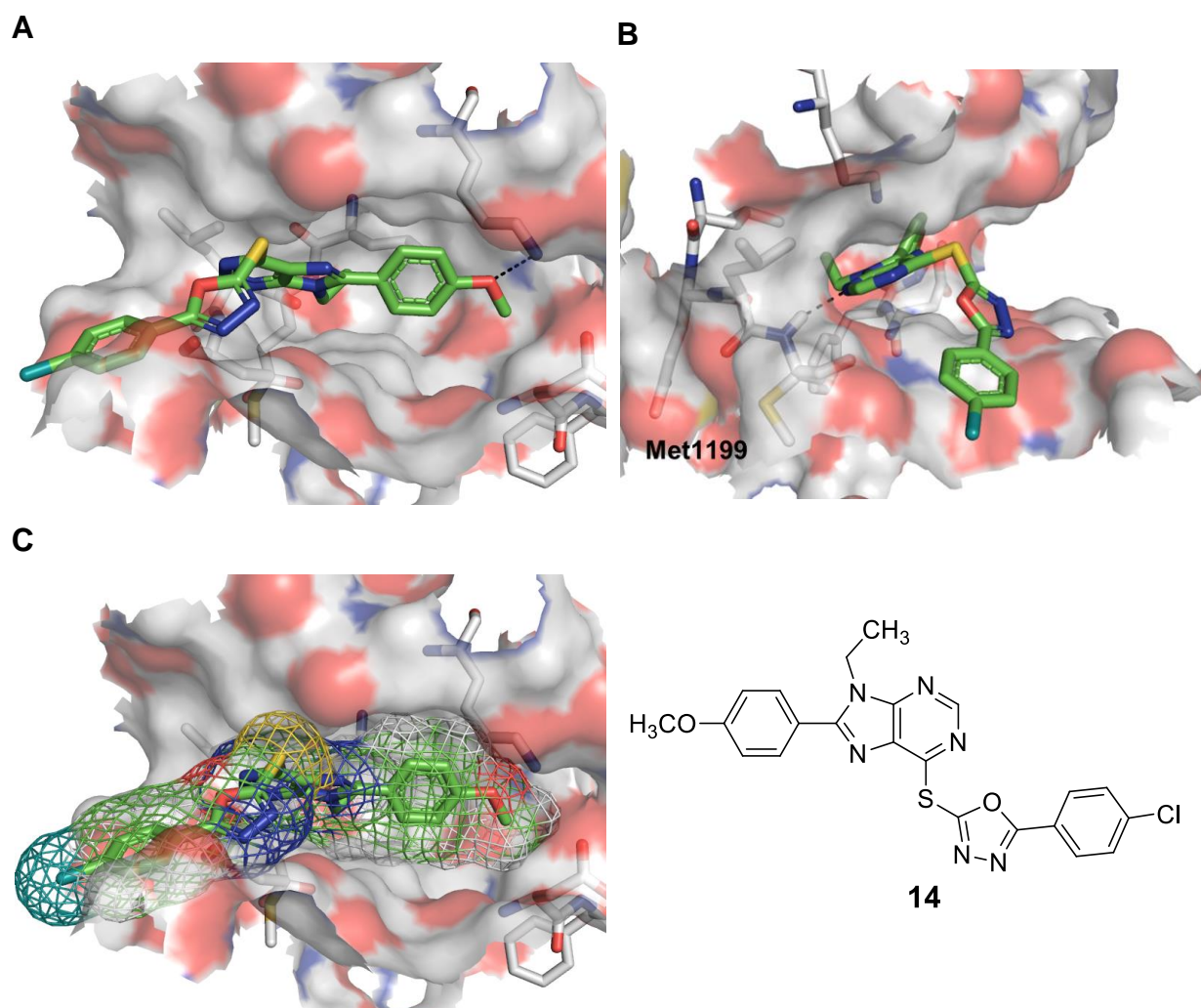


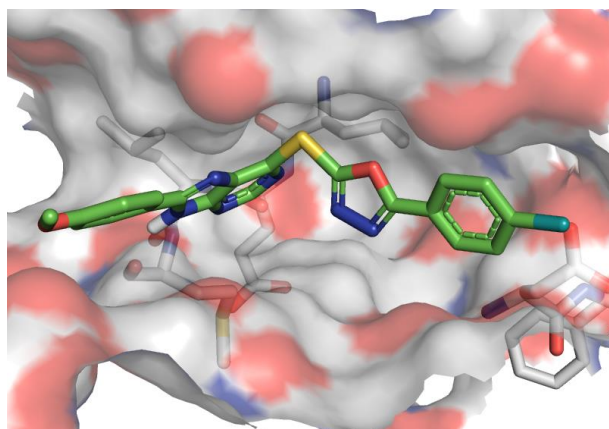
Abbildung 2-10: Docking der Verbindung **14** in die Bindetasche der ALK (PDB: 4MKC)

Beim Docken der Verbindung **14** ergaben sich ohne *constraints* keine als sinnvoll erachteten Posen. Daher wurde auch in diesem Fall ein *constraint* gesetzt, wobei eine Interaktion von dem Stickstoffatom N(3) des Puringrundkörpers zur NH-Gruppe des Met1199 (*gk+3*) der *hinge*-Region ausgebildet werden sollte. Diese Interaktion wird nur zum Teil vom GOLD generiert. Wie in Abbildung 2-10 zu sehen,

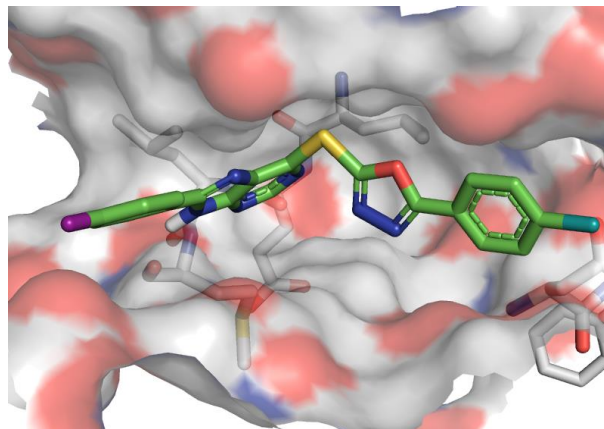
unterscheiden sich die Orientierungen der Verbindungen **14** und **12a** deutlich. Die Oxadiazolpartialstruktur und der *p*-Chlorphenylsubstituent von **14** ragen zur Lösemittel-zugewandten Seite. Der *p*-Methoxyphenylsubstituent am Puringrundkörper belegt die hintere Region der Bindetasche und die Methoxygruppe bildet dabei eine Wasserstoffbrücke zum konservierten Lysin aus. Die Ethylkette ist in Richtung des *gatekeepers* L1196 orientiert. Möglicherweise werden hier hydrophobe Wechselwirkungen ausgebildet. Die ATP-Bindetasche kann von **14** nicht optimal ausgenutzt werden, was einen deutlichen Verlust von Hemmaktivität an der ALK begründen könnte.

Des Weiteren wurde der Rest R<sup>1</sup> am Phenylsubstituenten des Puringrundkörpers (Grundstruktur **12**, Abbildung 1-23) variiert.

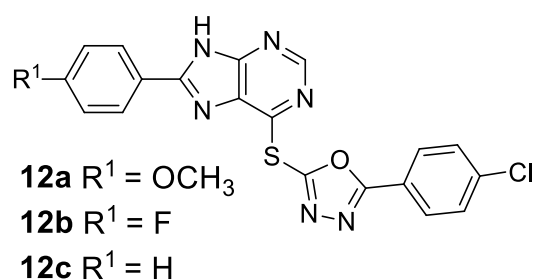
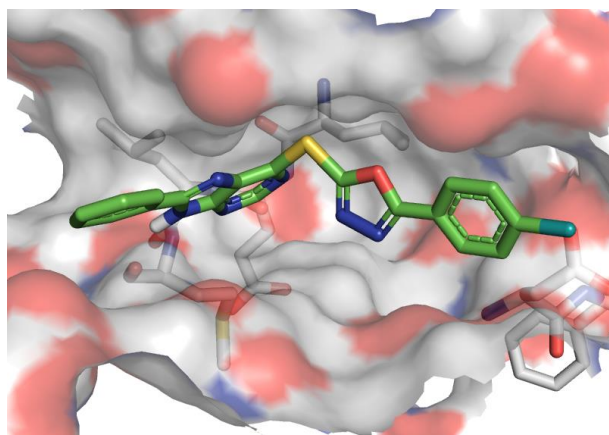
A - 12a



B - 12b



C - 12c



**Abbildung 2-11:** Vergleich der Verbindungen **12a** (Bild A), **12b** (Bild B) und **12c** (Bild C) in der Bindetasche der ALK (PDB: 4MKC)

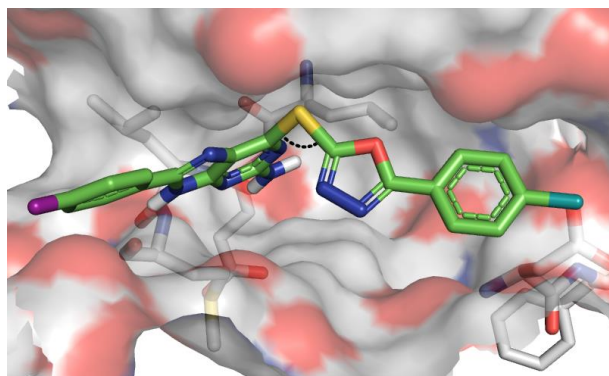
In Abbildung 2-11 werden drei Verbindungen verglichen, die verschiedene Substituenten R<sup>1</sup> tragen. Im Vergleich ist ersichtlich, dass die Posen sehr ähnlich



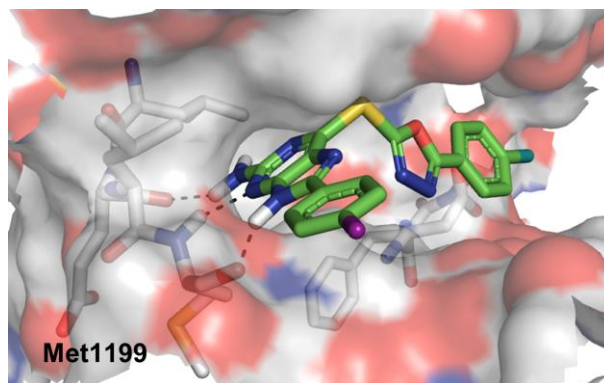
sind. In allen drei Fällen wurden *constraints* gesetzt, sodass vom Puringrundkörper zwei Wasserstoffbrücken zum Met1199 der *hinge*-Region ausgebildet werden. Somit ist jeweils der Puringrundkörper zur *hinge*-Region orientiert. Die Oxadiazolpartialstruktur ist im mittleren Bereich der Bindetasche positioniert, wobei der Thioether in allen Fällen einen Bindungswinkel von  $100^\circ$  aufweist. Der *p*-Chlorphenylrest liegt dabei im hinteren Bereich der Bindetasche. Der aromatische Ring am Puringrundkörper weist in diesem Fall unterschiedliche Substituenten auf. Trotzdem zeigt der aromatische Ring in allen drei Fällen die gleiche Orientierung. Insgesamt wird eine hohe Gleichförmigkeit der Positionierung in der Bindetasche beobachtet. Daher scheint das Substitutionsmuster an dieser Stelle keinen Einfluss auf den Bindemodus der Liganden zu nehmen.

Wie in Kapitel 1.6 beschrieben, sollte die Grundstruktur **12** um eine Aminogruppe erweitert werden (Grundstruktur **13**), um eine zusätzliche Interaktion zur *hinge*-Region zu ermöglichen.

A



B



C

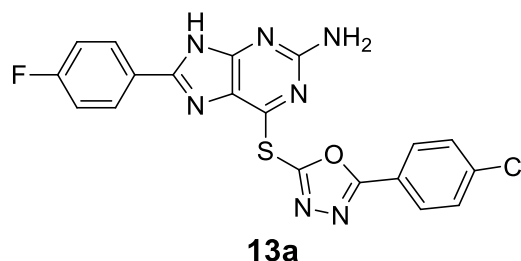
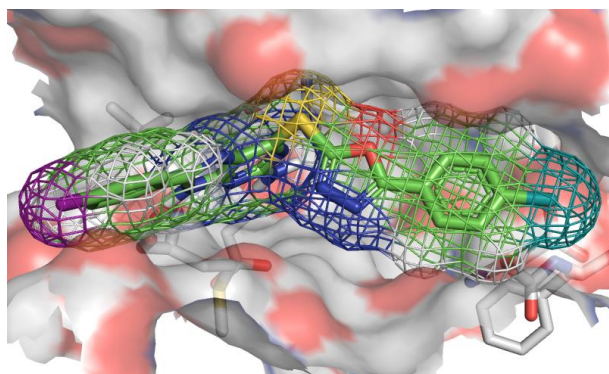
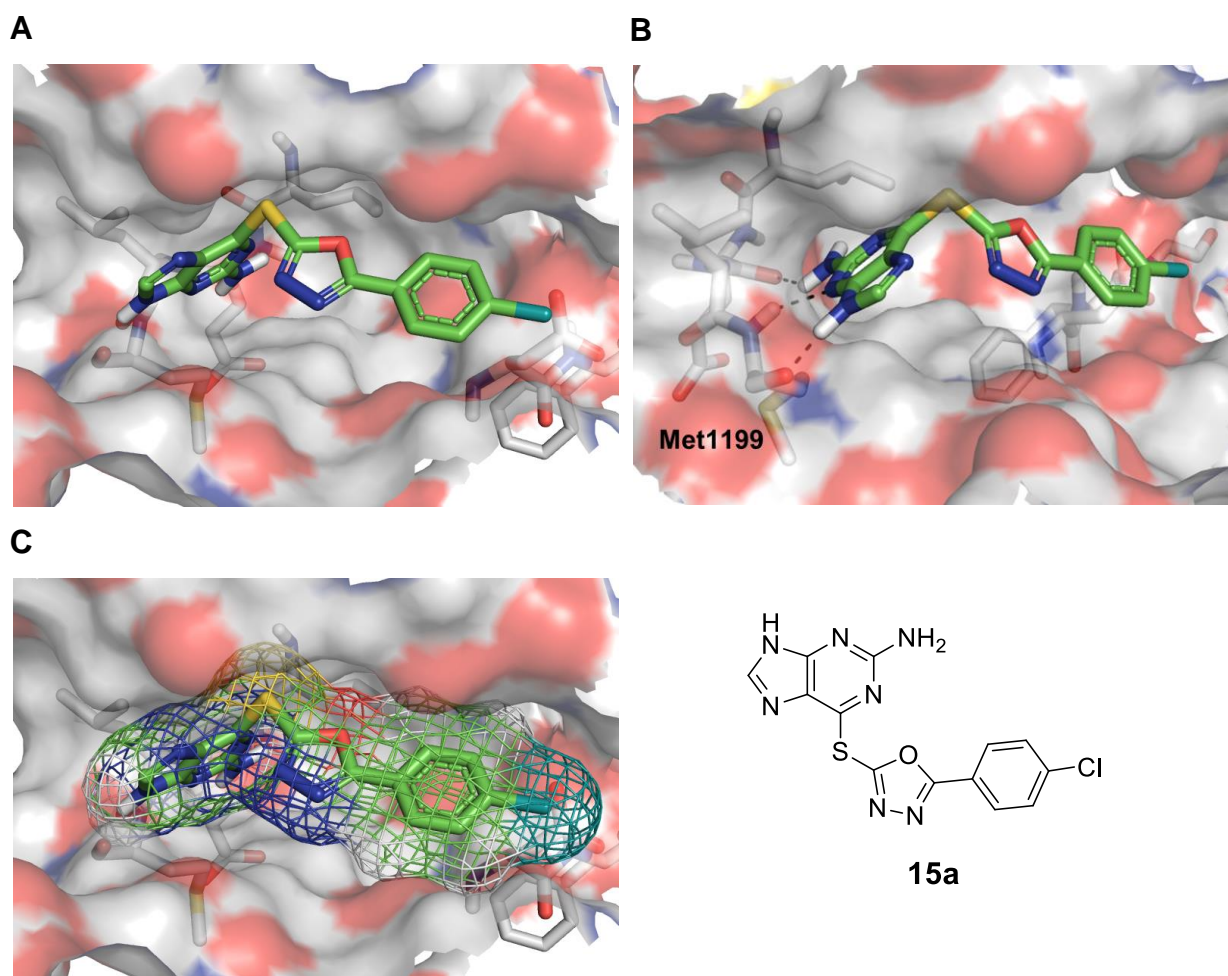


Abbildung 2-12: Docking der Verbindung **13a** in die Bindetasche der ALK (PDB: 4MKC)

Abbildung 2-12 zeigt das *docking*-Experiment der Verbindung **13a** in die Kristallstruktur 4MKC der ALK. Die Lage des Liganden ist ähnlich zu der von Verbindung **12b** (Abbildung 2-11). Wie in vorherigen Experimenten beschrieben wurden zwei *constraints* gesetzt, um sinnvolle Posen zu erhalten. Dadurch fungiert die NH-Gruppe des Met1199 (*gk*+3) als Wasserstoffbrückendonator gegenüber dem N(3)-Stickstoffatom des Puringrundkörpers (Bindungslänge 2.9 Å, Bindungswinkel 152°) und die Carbonylfunktion des Met1199 als Wasserstoffbrückenakzeptor gegenüber der N(9)H-Gruppe des Liganden (Bindungslänge 2.5 Å, Bindungswinkel 153°). Durch die primäre Aminogruppe der Verbindung **13a** wird eine zusätzliche Wasserstoffbrücke ermöglicht, da diese funktionelle Gruppe als Wasserstoffbrückendonator für die Carbonylfunktion des Glu1197 (*gk*+1) dient (Bindungslänge 2.8 Å, Bindungswinkel 163°). Die Ausbildung dieser zusätzlichen Interaktion wird von dem *docking*-Programm GOLD ohne weitere Vorgaben erkannt. Die weitere Lage des Liganden ist vergleichbar mit der von Verbindung **12b**. Die Oxadiazolpartialstruktur belegt auch hier den zentralen Raum der Bindetasche, wobei der Thioetherbindungswinkel 100° beträgt. Der *p*-Chlorphenylsubstituent ist im hinteren Teil der Bindetasche positioniert. Die Ausbildung der weiteren Interaktion zur *hinge*-Region könnte die Affinität des Liganden zu der Kinase steigern, was möglicherweise eine Verbesserung der Aktivität bewirkt.

Im Zusammenhang mit Verbindung **13a** wurde auch untersucht, welche Auswirkungen das Entfernen des aromatischen Ringes an der Puringpartialstruktur auf den Bindemodus hat. Abbildung 2-13 zeigt eine Pose des *docking*-Experimentes der Verbindung **15a** in der Bindetasche der ALK. Die Pose ist sehr ähnlich zu der von Verbindung **13a** (Abbildung 2-12). Auch hier werden drei Wasserstoffbrücken zur *hinge*-Region ausgebildet. Die NH-Gruppe des Met1199 ist dabei ein Wasserstoffbrückendonator für das N(3)-Stickstoffatom des Liganden (Bindungslänge: 2.9 Å; Bindungswinkel: 151°), wobei sich eine weitere Wasserstoffbrücke zwischen der Carbonylfunktion des Met1199 und der N(9)H-Gruppe des Liganden ausbildet (Bindungslänge: 2.7 Å; Bindungswinkel: 160°). Zudem wird eine dritte Wasserstoffbrücke durch GOLD erkannt. Diese bildet sich zwischen der Carbonylfunktion des Glu1197 (*gk*+1) und der 2-Aminogruppe des Puringrundkörpers aus (Bindungslänge: 2.5 Å; Bindungswinkel: 118°). Auch die Ausrichtung der Oxadiazolpartialstruktur und des *p*-Chlorphenylsubstituenten ist vergleichbar zu der von Verbindung **13a**. Der Thioetherbindungswinkel beträgt

ebenfalls 100°. Durch das Fehlen des aromatischen Restes am Puringrundkörper wird der dem Lösemittel-zugewandte Bereich der ATP-Bindetasche nicht besetzt. Das Entfernen des aromatischen Ringes an der Verbindung **13a** nimmt insgesamt nur geringen Einfluss auf den Bindemodus der Substanz. Jedoch könnte die geringere Ausfüllung des Lösemittel-zugewandten Bereichs Auswirkungen auf die ALK-inhibitorische Aktivität der Substanz **15a** haben.



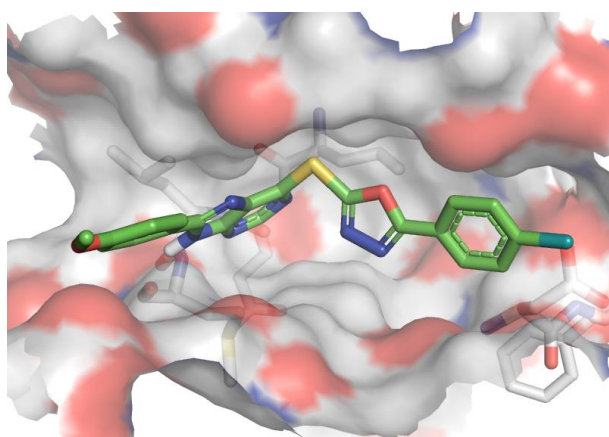
**Abbildung 2-13:** Docking der Verbindung **15a** in die Bindetasche der ALK (PDB: 4MKC)

### 2.3.3 Variation an der Oxadiazolpartialstruktur

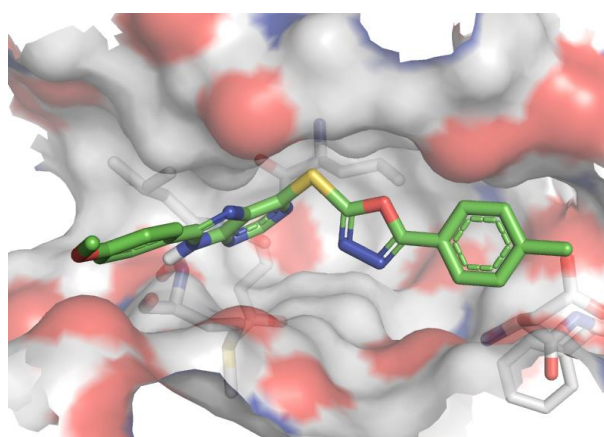
Weitere Variationsmöglichkeiten bietet die Oxadiazolpartialstruktur, wobei der Rest R<sup>2</sup> (siehe Abbildung 1-23; Grundstruktur **12**) eine Vielzahl verschiedener Substitutionsmöglichkeiten eröffnet.



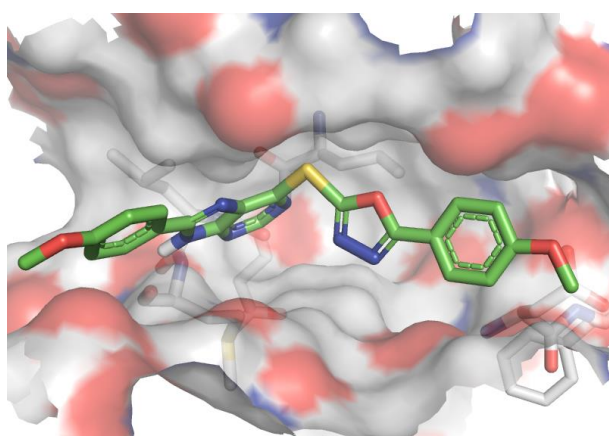
A - 12a



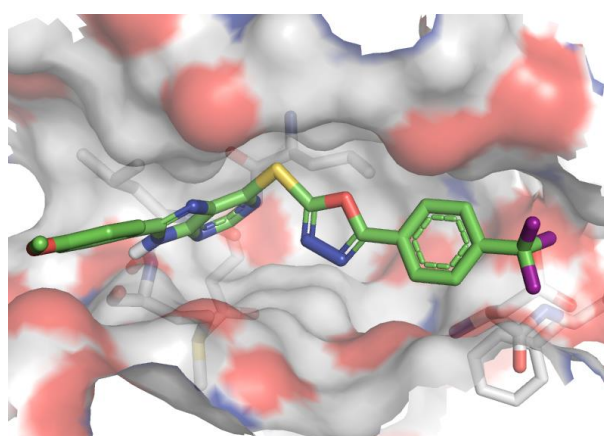
B - 12d



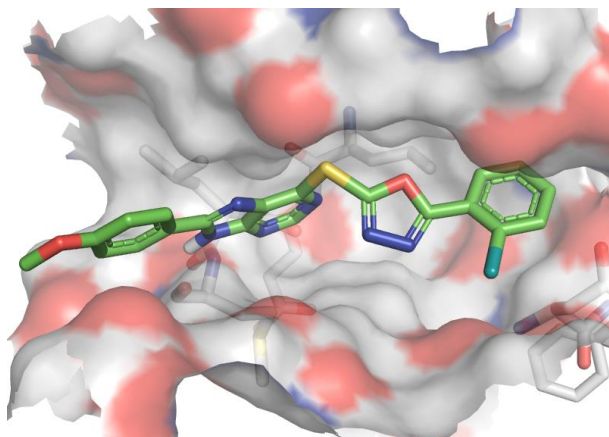
C - 12e



D - 12f



E - 12g



F - 12h

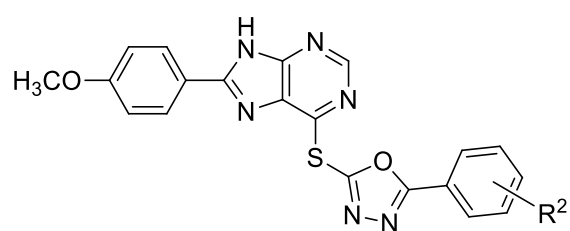
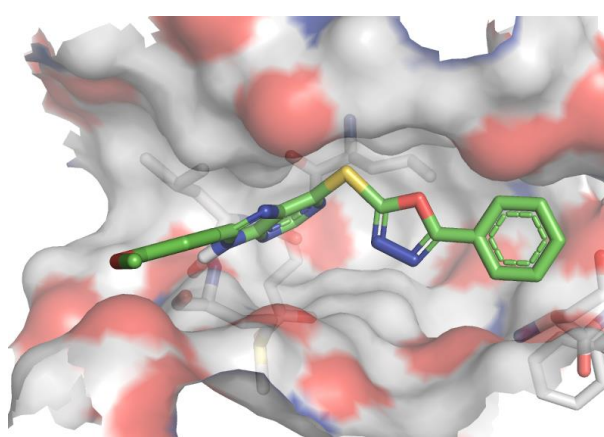
12a  $R^2 = 4\text{-Cl}$ 12d  $R^2 = 4\text{-CH}_3$ 12e  $R^2 = 4\text{-OCH}_3$ 12f  $R^2 = 4\text{-CF}_3$ 12g  $R^2 = 2\text{-Cl}$ 12h  $R^2 = \text{H}$ 

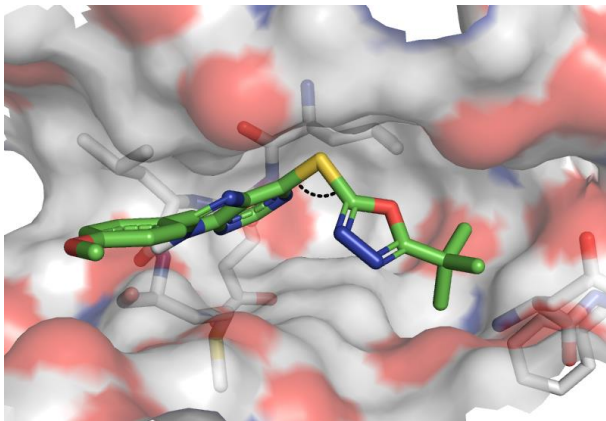
Abbildung 2-14: Vergleich verschiedener Substituenten  $R^2$  an der Oxadiazolpartialstruktur; *Docking* in die Bindetasche der ALK (PDB: 4MKC)

Beim Vergleich verschiedener Substituenten  $R^2$  fällt auf, dass die grundsätzliche Positionierung der jeweiligen Liganden in der ATP-Bindetasche der ALK sehr ähnlich ist (Abbildung 2-14). In allen Fällen wurden *constraints* gesetzt, sodass von der Purinpartialstruktur zwei Wasserstoffbrücken zum Met1199 (*gk+3*) der *hinge*-Region ausgebildet werden. Auch der *p*-Methoxyphenylrest des Puringrundkörpers nimmt eine ähnliche Pose ein. Weiterhin ist den Posen gemein, dass die Oxadiazolpartialstruktur im mittleren Bereich der Bindetasche positioniert ist, während der aromatische Rest in den hinteren Teil der Bindetasche ragt. Dabei fällt auf, dass die Ausrichtung dieses Restes trotz unterschiedlicher Substitutionsmuster sehr ähnlich ist. Verbindung **12h** beinhaltet einen unsubstituierten Phenylring, der diesen Bereich weniger gut auszufüllen scheint als die *para*-substituierten Analoga (**12a**, **12d-f**). Ein ähnliches Bild zeigt sich bei dem *o*-Cl-Derivat (**12g**). Hier ist die Orientierung des aromatischen Ringes etwas abweichend. Der Chlorsubstituent weist in Richtung des Bodens der Bindetasche und der hintere Bereich wird auch hier weniger gut ausgenutzt. Unterschiede zwischen *para*-substituierten Derivaten sind kaum zu erkennen, was die Erklärung von möglichen Aktivitätsunterschieden erschwert. Jedoch scheint ein Substituent in *para*-Position günstig zu sein, da auf diese Weise der hintere Bereich der ATP-Bindetasche sinnvoll belegt wird.

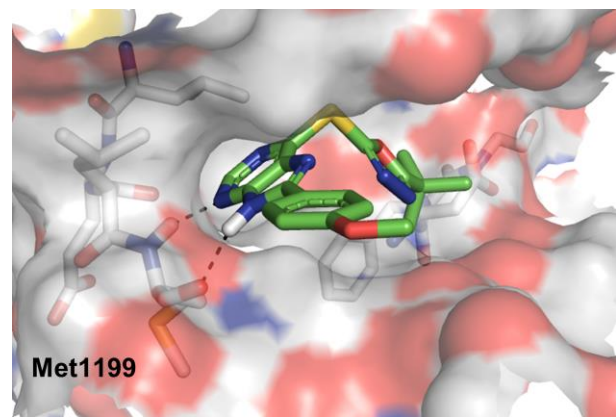
Weiterhin wurde untersucht, welchen Einfluss die Substitution des aromatischen Restes an der Oxadiazolpartialstruktur gegen einen aliphatischen Rest auf den Bindemodus der Substanz nimmt. Beim Docken der Verbindung **12i** trat im Vergleich zu den bisherigen Experimenten eine Besonderheit auf. In diesem Fall fand sich unter den zehn am höchsten bewerteten von GOLD generierten Posen eine, die die gewünschten Wasserstoffbrücken zu Met1199 ausbildete, ohne dass das Setzen von *constraints* nötig war. Diese ist in Abbildung 2-15 wiedergegeben. Die Lage in der ATP-Bindetasche ist dabei vergleichbar mit den bisher beschriebenen Zielstrukturen. Auch hier bilden sich zwischen der NH-Gruppe des Met1199 (*gk+3*) und dem N(3)-Atom des Purins (Bindungslänge 3.3 Å, Bindungswinkel 138°) sowie zwischen der Carbonylfunktion des Met1199 und der N(9)H-Gruppe des Liganden (Bindungslänge 2.7 Å, Bindungswinkel 147°) Interaktionen in Form von zwei Wasserstoffbrücken aus (Abbildung 2-15, B). Der Thioetherbindungswinkel beträgt 99°, wobei die Oxadiazolpartialstruktur im mittleren Bereich der Bindetasche liegt. Der *tert*-Butylrest ragt in den hinteren Bereich der Bindetasche, scheint diesen aber ähnlich wie die Verbindungen **12g,h** weniger gut auszufüllen.



A



B



C

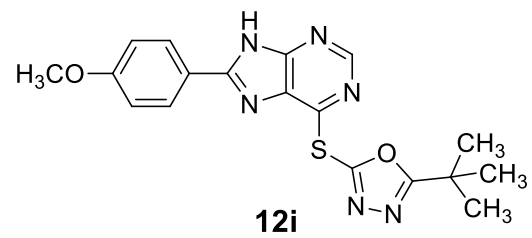
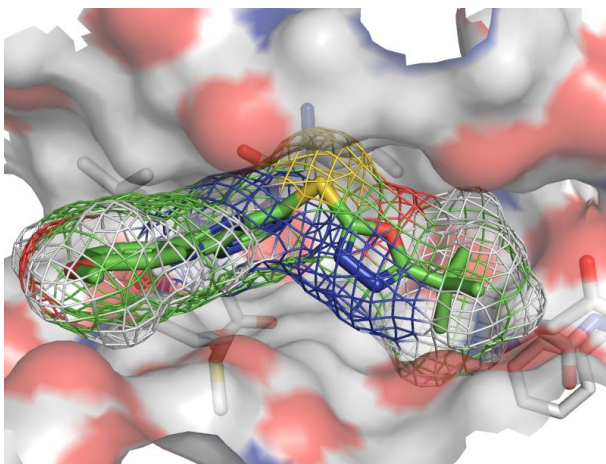


Abbildung 2-15: Docking der Verbindung **12i** in die Bindetasche der ALK (PDB: 4MKC)

## 2.4 Schlussfolgerungen

Durch *docking*-Experimente einerseits und durch die Beobachtungen aus vorhandenen Kristallstrukturen andererseits konnten sinnvolle Posen der geplanten Syntheseverbindungen in der Bindetasche der ALK generiert werden. Zur Bestätigung des beschriebenen Bindemodus ist jedoch eine Cokristallstruktur der ALK mit einer der Zielstrukturen notwendig.

Dennoch lassen sich Hypothesen aus den gewonnenen Informationen ableiten. Der Rest  $R^2$  an der Oxadiazol-Teilstruktur (Abbildung 2-16) bietet breite Variationsmöglichkeiten. Dabei können sowohl aliphatische als auch aromatische Reste eingeführt werden. Aromaten mit einem Substituenten in *para*-Position scheinen dabei günstig zu sein. Die Einführung einer Aminogruppe am Puringrundkörper scheint toleriert zu werden, ohne den Bindemodus zu stören (Rest  $R^3$ , Grundstruktur **13**, Abbildung 2-16). Außerdem wird dadurch eine zusätzliche Interaktion zur *hinge*-Region ermöglicht. Ein weiterer positiver Aspekt dieser Strukturmodifikation ist, dass die physikochemischen Eigenschaften durch Steigerung der Polarität verbessert werden. Im Gegensatz dazu stört eine Ethylierung der N(9)H-Gruppe des Purins den Bindemodus des Liganden erheblich. Auch eine unterschiedliche Substitution des Restes  $R^1$  scheint zulässig, ohne die Interaktion zur *hinge*-Region zu stören (Abbildung 2-16).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Grundstrukturen **12** und **13** eine hohe Anzahl an strukturellen Modifikationsmöglichkeiten bieten. Aus der gemeinsamen Betrachtung der *docking*-Ergebnisse und der biologischen Daten sollten abschließend Struktur-Wirkungsbeziehungen aufgestellt und der postulierte Bindemodus bewertet werden.

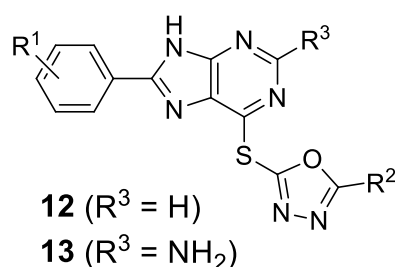


Abbildung 2-16: Grundstrukturen **12** und **13**

### 3. Synthese

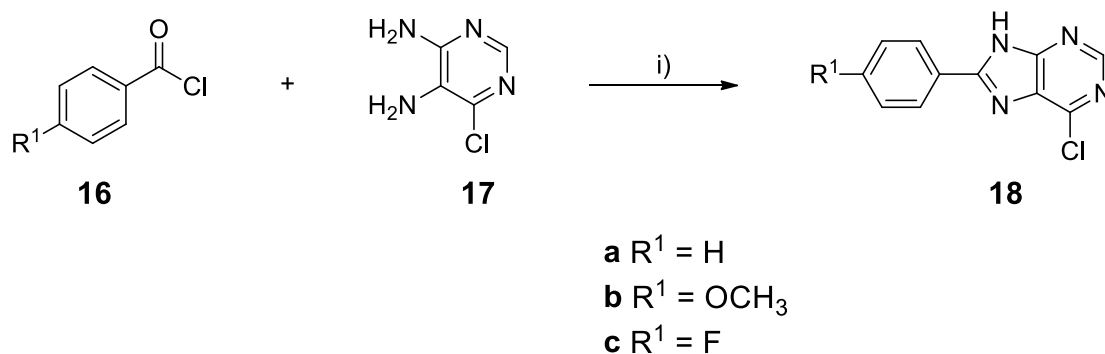
Purinderivate, die von den von WÖLFEL entwickelten Thienopyrimidinderivaten abgeleitet wurden, stellen die Grundstruktur der in dieser Arbeit beschriebenen Testverbindungen dar.<sup>84</sup> Ihre Synthese lässt sich in drei Abschnitte unterteilen und untergliedert sich in die Darstellung unterschiedlicher Purinderivate und verschiedener 1,3,4-Oxadiazol-2-thiole, die dann im letzten Schritt zu den jeweiligen Testverbindungen kombiniert werden können. Im Folgenden werden sowohl die einzelnen Syntheseschritte als auch analytische Besonderheiten vorgestellt.

#### 3.1 Synthese von Purinderivaten

Eine gängige Methode zur Darstellung von Purinderivaten geht von Diaminopyrimidinen aus, die mit Säurechloriden umgesetzt werden. Dabei kommt es zum Ringschluss und zur Ausbildung der Imidazolpartialstruktur.<sup>99</sup> Bereits 1900 beschrieb TRAUBE die Synthese von Purinderivaten wie Guanin, Coffein und Xanthin aus Diaminopyrimidinen.<sup>100, 101</sup> Seitdem findet sich in der Literatur eine Vielzahl an Vorschriften für derartige Reaktionen.<sup>102-105</sup>

Im vorliegenden Fall wurde eine abgewandelte Vorschrift nach IBRAHIM *et al.* genutzt.<sup>106</sup> Verschiedene aromatische Säurechloride **16** wurden mit 6-Chlorpyrimidin-4,5-diamin (**17**) in Phosphoroxychlorid unter Zusatz von Ammoniumchlorid zu den jeweiligen Purinderivaten **18** umgesetzt. Der Einsatz unterschiedlicher *para*-substituierter Säurechloride **16** führte zu einer Variation an Position 4' der 8-Arylpurinderivate **18** (Schema 3-1). IBRAHIM beschreibt, dass die Verwendung von POCl<sub>3</sub> und NH<sub>4</sub>Cl eine Hydrolyse an Position 6 des Produktes vermeidet, da das hydrolysierte Produkt direkt wieder chloriert wird.<sup>106</sup> Der Einsatz von 6-Chlorpyrimidin-4,5-diamin bietet den entscheidenden Vorteil, dass der Chlorsubstituent die Purinderivate für eine nucleophile Substitution zugänglich macht, was viele Derivatisierungsmöglichkeiten eröffnet.

Zur Aufarbeitung des Reaktionsgemisches wurde der Ansatz nach beendeter Reaktion langsam auf Eiswasser unter Eiskühlung gegeben und mit einer  $\text{NH}_3$ -Lösung (25%) neutralisiert (pH 7 – 8). Der ausgefallene Feststoff wurde abgesaugt und konnte ohne weitere Aufreinigung direkt für die Synthese der Testverbindungen eingesetzt werden (Kapitel 3.5).



Schema 3-1: Synthese von Purinderivaten **18**: i)  $\text{POCl}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 100 °C, 15 – 24 h

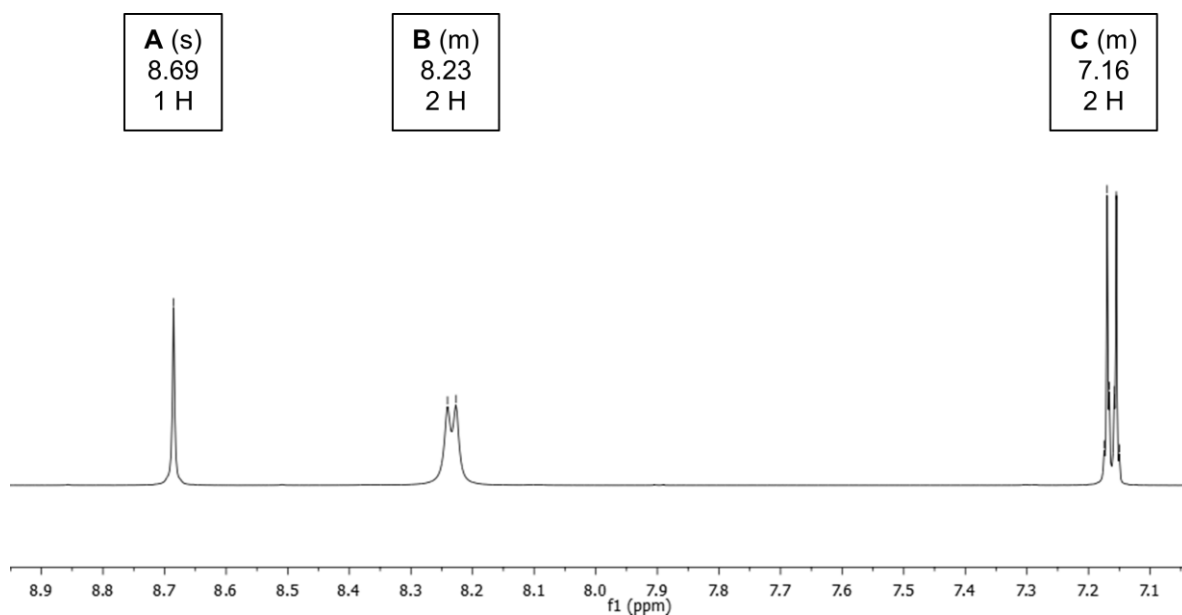
Bei der Optimierung der Synthesen der Derivate **18a** – **18c** ergaben sich unterschiedliche Versuchsbedingungen. Bei der Herstellung von **18a** war ein Überschuss des entsprechenden Säurechlorides **16a** von Vorteil. Außerdem war im Vergleich zu den Verbindungen **18b** und **18c** eine längere Reaktionszeit notwendig. Für die Synthese der Verbindungen **18b** und **18c** konnten die Edukte im äquimolaren Verhältnis eingesetzt werden (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: Versuchsbedingungen und Reinheit der Rohprodukte bei der Synthese der Derivate von Verbindung **18**

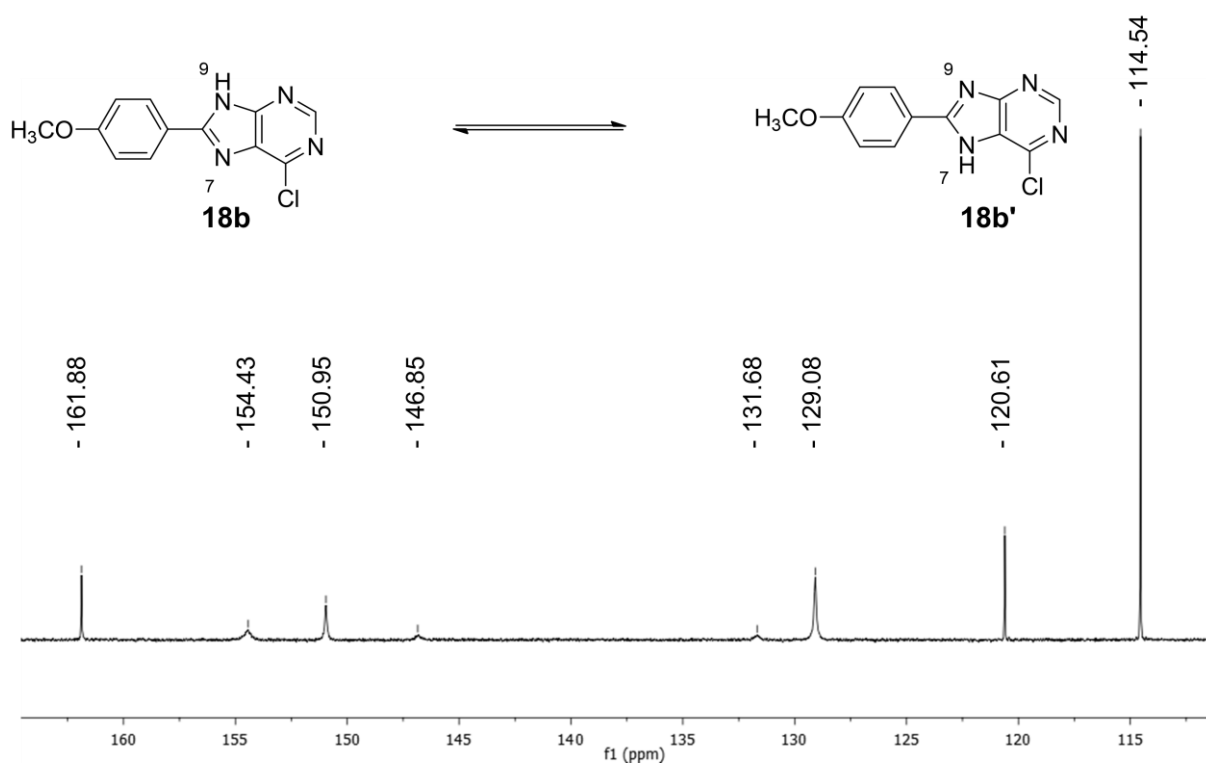
Nr.	Verhältnis 16:17	Reaktionszeit [h]	Reinheit des Rohproduktes [%]
<b>18a</b>	5:1	24	90 – 95
<b>18b</b>	1:1	15	90 – 95
<b>18c</b>	1:1	15	70 – 84

In den NMR-Spektren der Verbindung **18b** wurden einige Besonderheiten beobachtet, die im Folgenden näher erläutert werden. Eine vielfach beschriebene Tautomerisierung von Purinen wird vor allem zwischen der N(9)-H- und N(7)-H-Form beobachtet. Substitutionsmuster, Temperatur und Lösemittel beeinflussen dabei die Ausbildung der verschiedenen Tautomere. Dieser Effekt hat starken Einfluss auf die NMR-Spektren.<sup>107-109</sup> THORPE *et al.* beschreiben <sup>13</sup>C-NMR-Spektren für verschiedene Purinderivate. Dabei stellen sie fest, dass je nach Substitutionsmuster vor allem die beiden Kohlenstoffatome der Anellierungspositionen sehr breite Signale im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum zeigen. Diese Beobachtung führen sie auf das Auftreten der N(9)-H- und der N(7)-H-Isomere zurück.<sup>110</sup> BARTL *et al.* zeigen Untersuchungen zu NMR-Spektren von Purinen bei verschiedenen Temperaturen. Beobachtet wird dabei, dass bei Niedrigtemperaturmessungen Signale für verschiedene Tautomere im NMR-Spektrum zu sehen sind, da bei geringerer Temperatur der chemische Austauschprozess zwischen den Tautomeren verlangsamt wird. Bei höheren Temperaturen wird nur ein Signalsatz mit schärferen Signalen erkannt, da es hier zu einer Koaleszenz der Signale kommt. Bei höheren Temperaturen bilden sich deshalb aus den Signalen von isomeren Verbindungen Durchschnittssignale.<sup>111, 112</sup>

Ähnliche Beobachtungen können bei Verbindung **18b** gemacht werden. Hier hat die Tautomerisierung ebenfalls Auswirkungen auf die NMR-Spektren. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum sind zwei Multipletts bei 8.23 ppm (Signal B) und 7.16 ppm (Signal C) zu sehen, die den aromatischen Protonen des *p*-Methoxyphenylsubstituenten zugeordnet werden können. Dabei ist das Signal B deutlich verbreitert, wodurch das typische Aufspaltungsmuster eines *para*-substituierten Aromatens mit einem AA'XX'-Spinsystem hier nicht zu erkennen ist (Abbildung 3-1). Das Signal A wird durch die CH-Gruppe des Puringrundkörpers verursacht. Stärker ist der Effekt im <sup>13</sup>C-NMR zu erkennen. Die Signale bei 131.68, 146.85 und 154.43 ppm sind sehr breit und heben sich kaum von der Basislinie ab. Außerdem ist ein Kohlenstoffsignal nicht zu detektieren (Abbildung 3-2).

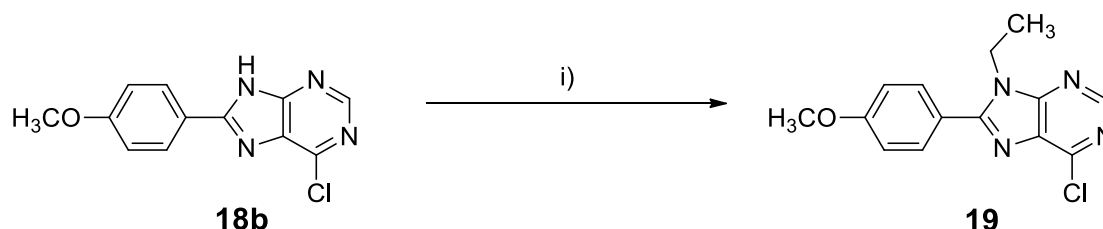


**Abbildung 3-1:** Ausschnitt des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums der Verbindung **18b**; Aromatischer Bereich; Anmerkung: die chemische Verschiebung der Multipletts (m) wird hier und in den folgenden Darstellungen mit einem durchschnittlichen Wert in ppm angegeben



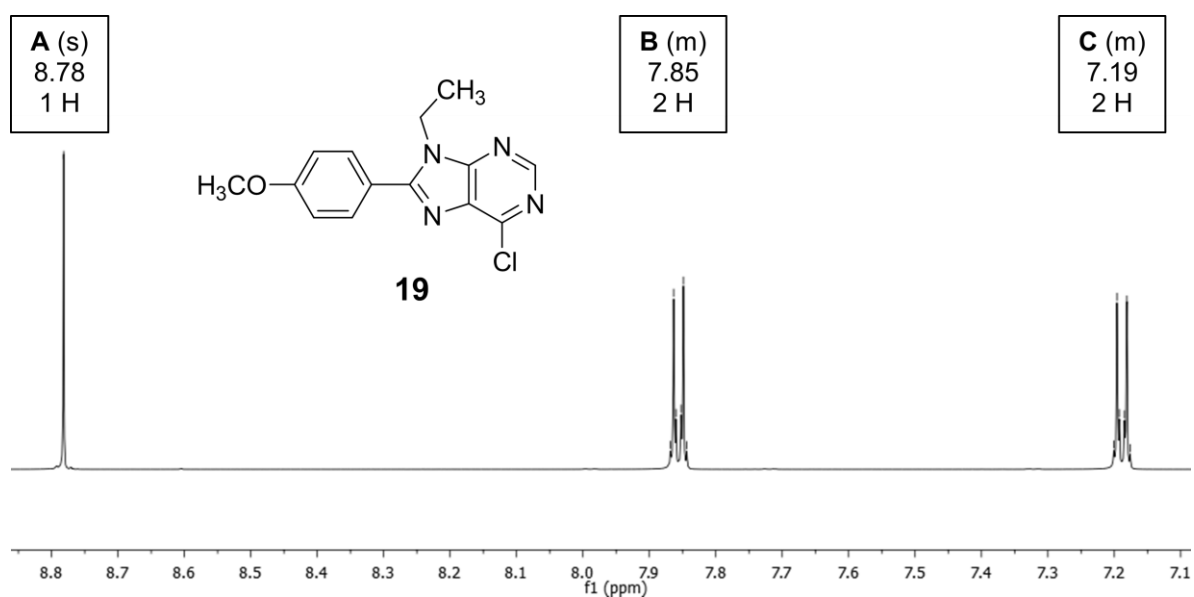
**Abbildung 3-2:** Verbreiterung von Signalen im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum der Verbindung **18b** durch Tautomerie

Zur Bestätigung dieser Hypothese wurde in Anlehnung an eine Vorschrift von CELIK *et al.* eine N-Alkylierung durchgeführt.<sup>113</sup> Diese sollte die Tautomerisierung unterbinden und entsprechende Änderungen in den NMR-Spektren zur Folge haben. Dazu wurde Verbindung **18b** in DMF mit Jodethan unter Zusatz von  $K_2CO_3$  bei Raumtemperatur umgesetzt (Schema 3-2).

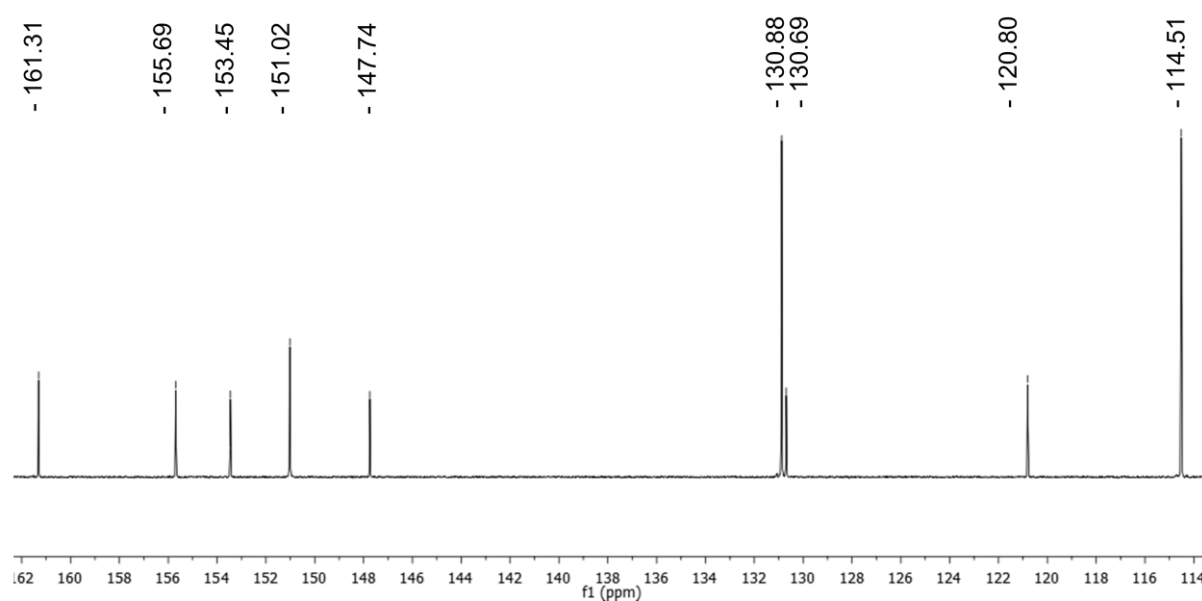


Schema 3-2: Ethylierung von Verbindung **18b**: i) Jodethan,  $K_2CO_3$ , DMF, RT, 30 h

In den NMR-Spektren von Verbindung **19** zeigt sich ein deutlicher Effekt. Im  $^1H$ -NMR-Spektrum erscheint das zuvor sehr breite Multipllett bei 8.23 ppm nun hochfeldverschoben bei 7.85 ppm und ist wesentlich schmaler (Abbildung 3-3). Hier zeigt sich im Unterschied zu der nicht-alkylierten Verbindung **18b** auch das gut aufgelöste typische Aufspaltungsmuster eines *para*-substituierten Aromaten. Stärker sind die Auswirkungen im  $^{13}C$ -NMR-Spektrum zu sehen. Die zuvor kaum sichtbaren Signale sind nun schmaler und heben sich eindeutig von der Basislinie ab. Im Unterschied zu Verbindung **18b** sind außerdem alle Signale für Kohlenstoffatome ohne Wasserstoffsubstitution detektierbar (Abbildung 3-4).



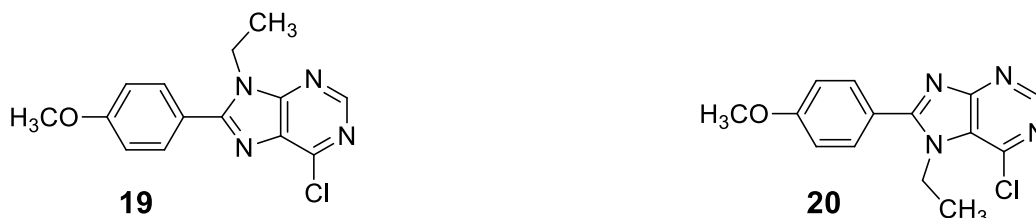
**Abbildung 3-3:** Ausschnitt des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums der Verbindung **19**; aromatischer Bereich



**Abbildung 3-4:** Ausschnitt des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums der Verbindung **19**

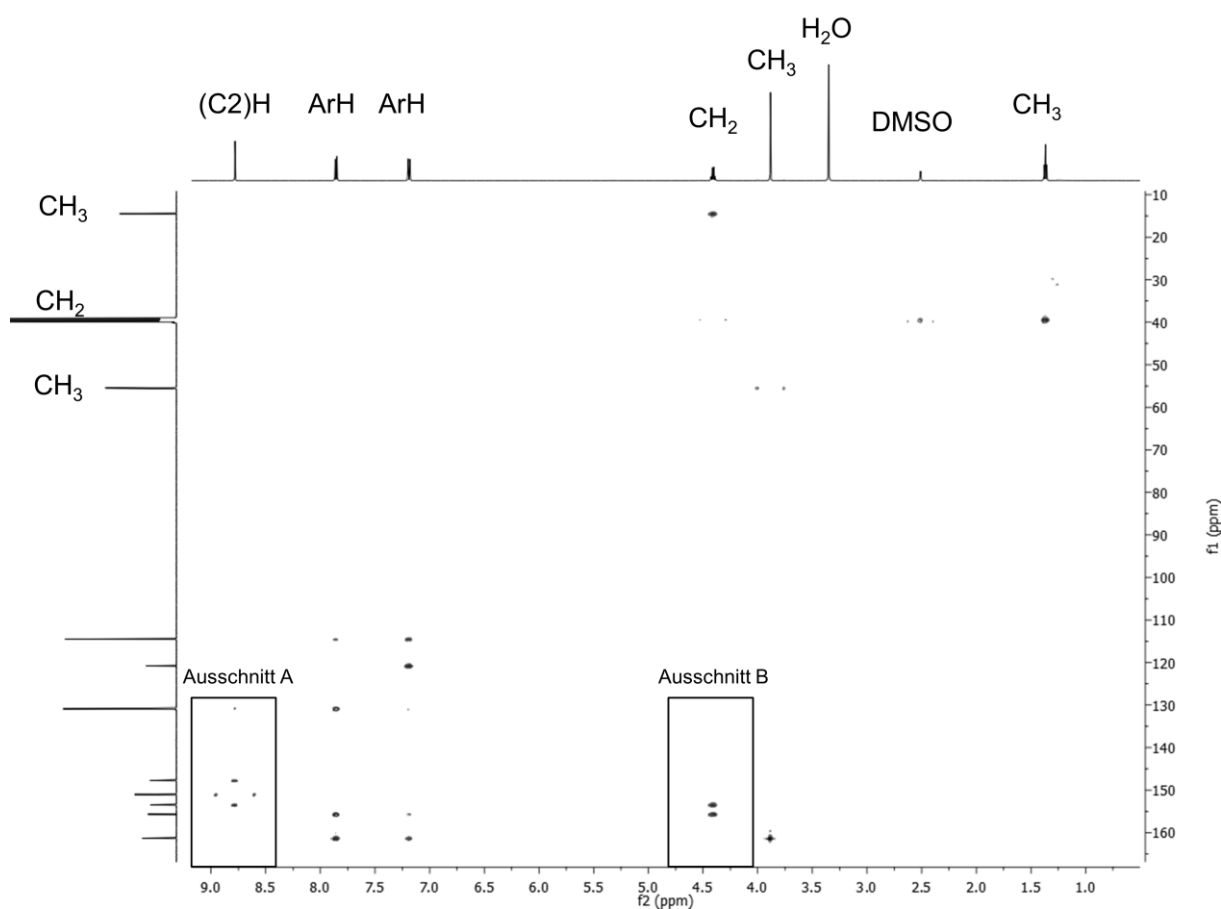


Aus den  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren geht jedoch nicht hervor, ob Verbindung **19** oder die isomere Verbindung **20** entstanden ist (Schema 3-3). Die Auswertung von  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC und -HMBC-Spektren ermöglichte die Zuordnung von Struktur **19** zu dem erhaltenen Alkylierungsprodukt.



**Schema 3-3:** Mögliche Produkte **19** oder **20** als Ergebnis der Alkylierung von Verbindung **18b**

Abbildung 3-5 zeigt das  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum der Verbindung **19**. Für die Zuordnung der Alkylierungsposition sind vor allem die Ausschnitte A und B von Relevanz.



**Abbildung 3-5:**  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum der Verbindung **19**

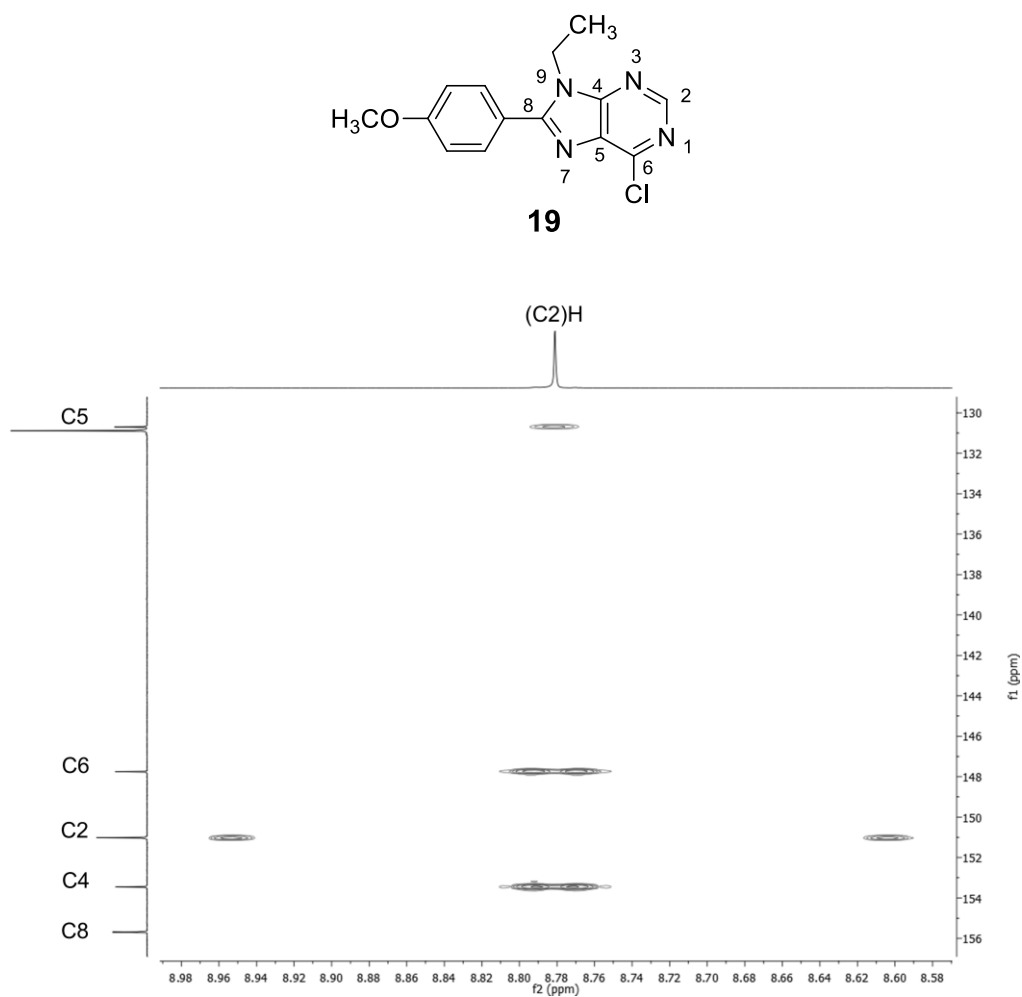


Abbildung 3-6:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum der Verbindung **19**; Ausschnitt A

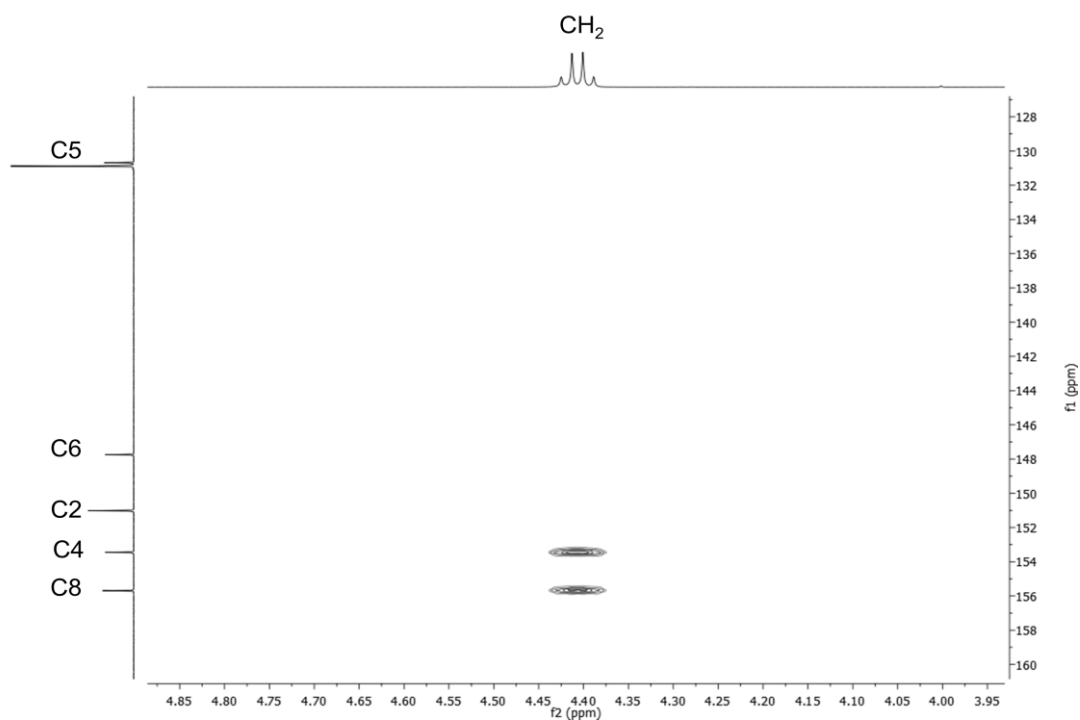


Abbildung 3-7:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum der Verbindung **19**; Ausschnitt B

Ausschnitt A zeigt die Kopplung des aromatischen Protons an C2 mit den benachbarten Kohlenstoffatomen (Abbildung 3-6). Zum Kohlenstoffatom C2 (151.0 ppm) ergibt sich ein Kreuzpeak mit einer sehr großen Kopplungskonstante. Weiterhin ist eine Kopplung zu den Kohlenstoffatomen C6 und C4 zu beobachten. Die Signale im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum liegen bei 147.7 und 153.5 ppm, wobei eine eindeutige Zuordnung hier noch nicht möglich ist. Außerdem ist ein schwacher Kreuzpeak zu C5 (153.5 ppm) zu sehen. Ausschnitt B zeigt die Kreuzpeaks, die bei der Kopplung der  $\text{CH}_2$ -Gruppe mit benachbarten Kohlenstoffatomen entstehen (Abbildung 3-7). Im tiefen Feld können dabei zwei Kreuzpeaks zu den Signalen bei 153.5 und 155.6 ppm beobachtet werden. Eine Alkylierung an Position 7 würde einen zusätzlichen Kreuzpeak zu C6 erwarten lassen, der hier nicht zu sehen ist. Das spricht dafür, dass die Alkylierung am N(9)-Atom erfolgte. Die Signale 147.7 und 153.5 lassen sich somit den Kohlenstoffatomen C6 und C4 zuordnen, was dadurch weiter bestätigt werden konnte, dass eine gesonderte Prozessierung des Spektrums den Isotopeneffekt des Chlorsubstituenten an C6 sichtbar machte. Dabei wird das entsprechende Signal im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum in zwei Signale im Verhältnis 1:3 für das  $^{37}\text{Cl}$ - und  $^{35}\text{Cl}$ -Isotop aufgespalten.<sup>114, 115</sup>

Von Verbindung **18c** konnte im Arbeitskreis von Prof. Peter G. Jones, TU Braunschweig, eine Kristallstruktur angefertigt werden (Abbildung 3-8). Dabei wurde im Kristall das N(9)H-Isomer identifiziert.

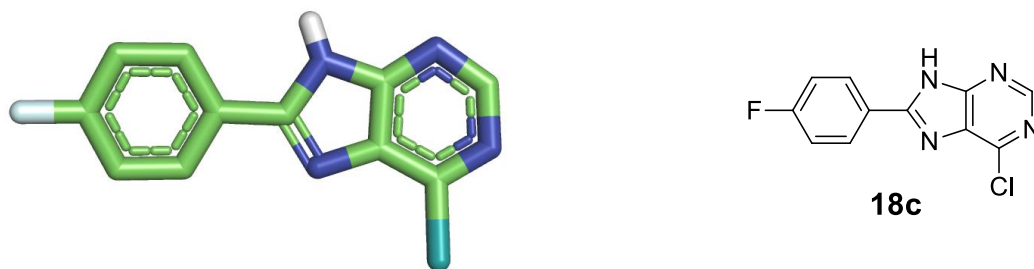
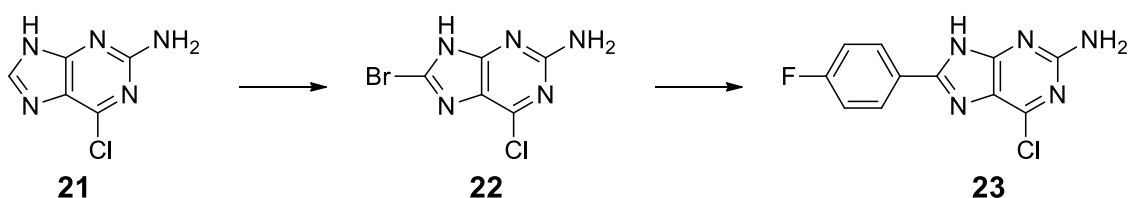


Abbildung 3-8: Kristallstruktur der Verbindung **18c**

### 3.2 6-Chlor-8-(4-fluorphenyl)-9H-purin-2-amin

Wie im Kapitel *molecular docking* beschrieben, sollte in die Grundstruktur eine zusätzliche Aminogruppe eingeführt werden, um eine weitere Interaktion zur *hinge*-Region zu ermöglichen. Zudem könnten so die physikochemischen Eigenschaften aufgrund der höheren Polarität der Testsubstanzen verbessert werden. Um zu 6-Chlor-8-(4-fluorphenyl)-9H-purin-2-amin (**23**) zu gelangen, war eine zweistufige Synthese geplant, die eine Bromierung von Verbindung **21** und eine anschließende Suzuki-Kupplung vorsah (Schema 3-4).



**Schema 3-4:** Geplante Syntheseroute zu 6-Chlor-8-(4-fluorphenyl)-9H-purin-2-amin (**23**)

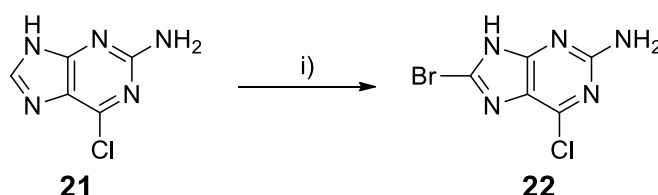
Zur Synthese von Verbindung **22** aus Verbindung **21** sollte eine Vorschrift von JANG *et al.* dienen. Dazu wurde Verbindung **21** in einem Essigsäure-Wasser-Gemisch mit Brom versetzt und bei 50 – 60 °C für 36 h gerührt.<sup>116</sup> Unter diesen Bedingungen konnte jedoch nach Aufarbeitung kein Produkt isoliert werden. Daher wurden verschiedene andere Methoden zur Synthese von **22** untersucht.

Eine weitere gängige Möglichkeit für Bromierungen ist die Verwendung von *N*-Bromsuccinimid (NBS) als Reagenz.<sup>117</sup> Nach einer Vorschrift von APPARI *et al.* wurde 2-Amino-6-chlorpurin (**21**) in Dichlormethan suspendiert und mittels Eis-Kochsalz-Mischung auf -8 °C gekühlt. Nach Zusatz von NBS wurde für 4 h bei -8 °C gerührt.<sup>118</sup> HPLC-Untersuchungen des Rohproduktes wiesen darauf hin, dass keine Umsetzung des Eduktes (**21**) stattgefunden hatte, sodass auch in diesem Fall nicht das gewünschte Produkt isoliert werden konnte.

LITINAS *et al.* beschreiben Bromierungen von 6-*N*-substituierten Purinen.<sup>119</sup> Daran angelehnt wurde eine Suspension von 2-Amino-6-chlorpurin (**21**) in Eisessig unter Zusatz von Natriumacetat langsam mit einer Lösung von Brom in Eisessig versetzt

und für 6 h bei 80 °C gerührt. Nach Aufarbeitung konnte auch hier kein Produkt identifiziert werden.

Daher wurde die oben beschriebene Vorschrift von JANG *et al.* wieder aufgegriffen und der Einfluss der Temperatur untersucht.<sup>116</sup> LAXER *et al.* führten die Bromierung von Adenin bei Raumtemperatur durch.<sup>120</sup> Deshalb wurde 2-Amino-6-chlorpurin (**21**) wiederum in einem Essigsäure-Wasser-Gemisch mit Brom versetzt und bei Raumtemperatur für 24 h gerührt. Anschließend erfolgte zur Aufarbeitung der erhaltenen Suspension der Zusatz einer Natriumthiosulfatlösung, um das im Überschuss vorliegende Brom zu entfernen. Dabei wurde solange Natriumthiosulfatlösung zugesetzt, bis die vorher orange Suspension keine weitere Entfärbung mehr zeigte. Nach Absaugen konnte **22** als Feststoff mit 90 – 95%iger Reinheit isoliert werden (Schema 3-5).



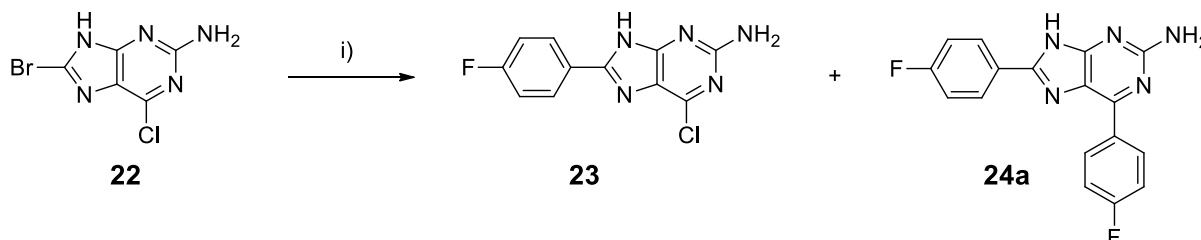
Schema 3-5: Synthese von Verbindung **22**: i) CH<sub>3</sub>COOH, Br<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, RT, 24 h

Der nun vorhandene Bromsubstituent macht Verbindung **22** für eine Suzuki-Kupplung zugänglich. Diese Palladium-katalysierte Kreuzkupplungsreaktion erlaubt die Derivatisierung von Halogenaromaten mit organischen Boronsäuren, wobei sich Diaryle ausbilden.<sup>121</sup>

In diesem Fall sollte Verbindung **22** mit *p*-Fluorphenylboronsäure umgesetzt werden (Schema 3-6). Dazu wurde ebenfalls die oben genannte Vorschrift von JANG *et al.* genutzt.<sup>116</sup> In ersten Syntheseversuchen zeigte sich, dass eine Aufreinigung von **22** mittels Säulenchromatographie trotz hoher Reinheit des Rohproduktes notwendig war. Die Reaktion wurde in einem Dioxan/Wasser-Gemisch unter Zusatz von K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> durchgeführt, wobei Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> als Katalysator diente.

Die Suzuki-Kupplung von Verbindung **22** erwies sich auf Grund von zwei vorhandenen Halogenatomen und somit zwei reaktiven Positionen im Molekül als

problematisch. Als Nebenprodukt ergab sich Verbindung **24a**, die durch zweifache Reaktion von Verbindung **22** mit *p*-Fluorphenylboronsäure entstand (Schema 3-6).



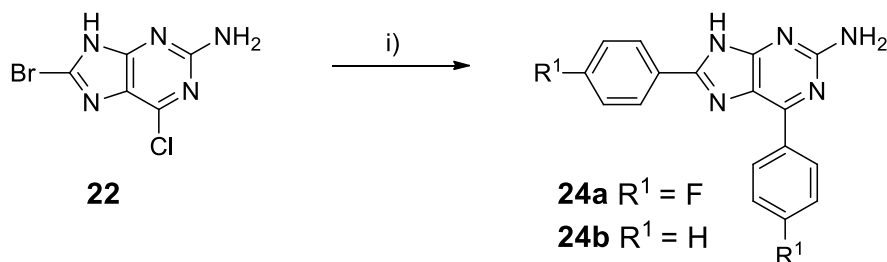
**Schema 3-6:** Produkte der Suzuki-Kupplung von Verbindung **22**: i) *p*-Fluorphenylboronsäure,  $K_2CO_3$ ,  $Pd(PPh_3)_4$ , Dioxan/Wasser 3:1

In anfänglichen Versuchen wurde die Synthese wie in der von JANG *et al.* beschriebenen Vorschrift unter konventionellen Bedingungen durch Erhitzen zum Rückfluss unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt.<sup>116</sup> Die in der Vorschrift angegebene Reaktionszeit von zwei Stunden reichte für eine vollständige Umsetzung nicht aus. Mit längerer Reaktionszeit entstand jedoch zunehmend Verbindung **24a**, was mittels DC- und HPLC-Untersuchungen beobachtet werden konnte.

Alternativ wurde die Synthese in einer Mikrowellenreaktion erprobt. Dabei wurden Temperaturen zwischen 80 °C und 140 °C gewählt und der Ansatz jeweils im ersten Durchlauf für 30 min umgesetzt. Bei anschließenden HPLC-Untersuchungen des Ansatzes zeigte sich, dass bei niedrigeren Temperaturen (80 °C) weniger von Verbindung **24a** entstand, jedoch die Umsetzung nicht vollständig war. Mit zunehmender Reaktionszeit (mehrere Mikrowellendurchläufe) nahm die Menge an Verbindung **24a** zu. Eine sequentielle Methode, in der **22** vorgelegt wurde und nach und nach kleine Anteile der *p*-Fluorphenylboronsäure zugegeben wurden, verbesserte die Ergebnisse nicht deutlich.

Durch einen dreifachen Überschuss an Boronsäure konnten bisubstituierte Derivate gezielt synthetisiert werden. Dabei wurde ebenfalls eine Mikrowellenreaktion durchgeführt, wobei der Ansatz für eine Stunde auf 130 °C erhitzt wurde (Schema 3-7). Die Synthese der Derivate **24a** und **b** zeigte, dass die gewählten Bedingungen

grundsätzlich geeignet sind, um Verbindung **22** in einer Suzuki-Kupplung umzusetzen.

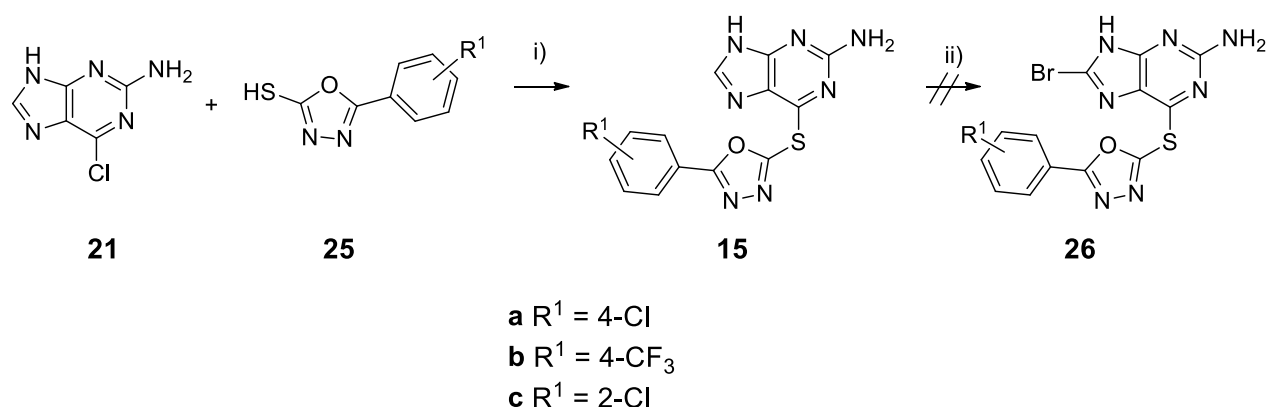


**Schema 3-7:** Synthese von bisubstituierten Derivaten **24**: i) *p*-Fluorphenylboronsäure bzw. Phenylboronsäure, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>,  $\mu$ W, Dioxan/Wasser 3:1, 130 °C

Da nach den oben beschriebenen Methoden Verbindung **23** nicht isoliert werden konnte, wurden alternative Syntheserouten zur Umgehung des bisubstituierten Produktes **24a** untersucht.

#### Alternative Syntheseroute I

Um die oben beschriebene Mehrfachsubstitution zu umgehen, wurde angestrebt Verbindung **21** zuerst mit einem 1,3,4-Oxadiazol-2-thiol **25** zu Derivat **15** umzusetzen, welches anschließend einer Bromierung unterzogen werden sollte (Schema 3-8). Verbindung **26** sollte darauffolgend die weitere Umsetzung im Rahmen einer Suzuki-Kupplung ermöglichen. Die Synthese von **15a-c** gelang mit verschiedenen 1,3,4-Oxadiazol-2-thiolen **25** und erfolgte Mikrowellen-gestützt in DMF unter Zusatz von Triethylamin. Verbindung **15b** wurde anschließend mit Brom in einem Essigsäure-Wasser-Gemisch bei Raumtemperatur umgesetzt, wobei ein Feststoff isoliert werden konnte, der nach NMR-Daten nicht dem gewünschten Produkt **26b** entsprach. Die alternative Syntheseroute I wurde daher nicht weiter verfolgt. Die Derivate **15** erwiesen sich trotzdem als nützlich, denn mit ihnen konnte geprüft werden, welche Auswirkungen das Fehlen eines aromatischen Substituenten an C8-Position der Purinpartialstruktur auf die biologische Aktivität der Substanzen hat.



**Schema 3-8:** Alternative Syntheseroute I: i) DMF, Triethylamin, 120 °C,  $\mu$ W, 30 min; ii) Br<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>COOH, H<sub>2</sub>O, RT

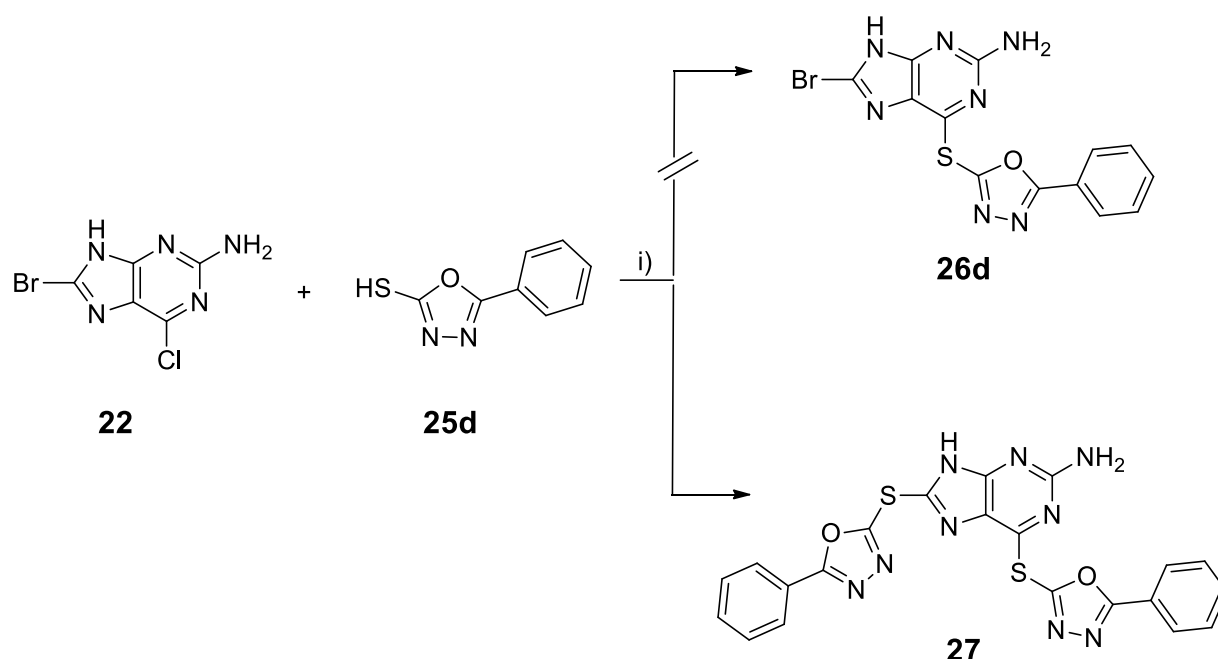
### Alternative Syntheseroute II

In einer weiteren alternativen Syntheseroute II wurde Verbindung **22** mit 5-Phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25d**) umgesetzt (Schema 3-9). Dies erfolgte nach einer abgewandelten Vorschrift von WOODRING in Propan-2-ol unter Zusatz von Triethylamin bei 85 °C und einer Reaktionszeit von 24 h.<sup>122</sup> Ziel war es zu prüfen, ob zuerst eine selektive Substitution des Chloratoms erfolgt, da dies eine anschließende Suzuki-Kupplung an der Position des Bromsubstituenten ermöglichen würde. WOODRING *et al.* setzten in der beschriebenen Methode entsprechend 6-Brom-4-chlorthieno[3,2-*d*]pyrimidin zuerst mit einem Anilinderivat um, um den Chlorsubstituenten auszutauschen und führten anschließend eine Suzuki-Kupplung durch.

Im ersten Versuch (a) wurden die Edukte **22** und **25d** äquimolar eingesetzt. Eine HPLC-Untersuchung des Ansatzes ergab das in Abbildung 3-9 dargestellte Chromatogramm, wobei drei Signale zu erkennen sind. Es lässt sich vermuten, dass eine Substitution des Chlor- oder des Bromatoms und in einer dritten Variante beider Positionen erfolgte. Da mit einer RP-Säule gearbeitet wurde, könnte es sich bei dem Signal bei 10.93 min um das zweifach substituierte Produkt handeln, denn durch das Vorhandensein von zwei Oxadiazolpartialstrukturen steigt die Lipophilie des Moleküls, sodass eine stärkere Interaktion mit der unpolaren RP-Säule und damit eine längere Retentionszeit zu erwarten ist. Um diese Vermutung zu unterstützen, erfolgte eine weitere Synthese (Versuch b) in analoger Weise; jedoch wurden die



Edukte **22** und **25d** im Verhältnis 1:2.5 eingesetzt und der Ansatz wurde auch in diesem Fall mittels HPLC vermessen. Dabei ergab sich das in Abbildung 3-10 gezeigte Chromatogramm. Hauptsächlich ist das Produkt entstanden, dessen Retentionszeit 10.9 min beträgt. Der nach der Reaktion erhaltene Feststoff enthielt mit einer Reinheit des Rohproduktes von ca. 90% das entsprechende Signal bei 10.90 min und konnte nach weiterer Aufreinigung als Verbindung **27** identifiziert werden (Schema 3-9). Die von WOODRING beschriebene Methode konnte daher nicht auf die gezielte Synthese von **26d** übertragen werden.



Schema 3-9: Alternative Syntheseroute II: i) Triethylamin, Propan-2-ol, 85 °C, 24 h

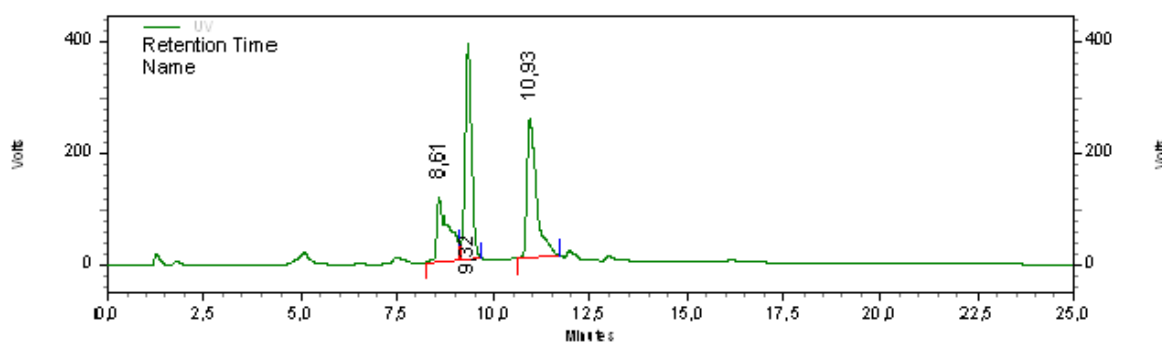
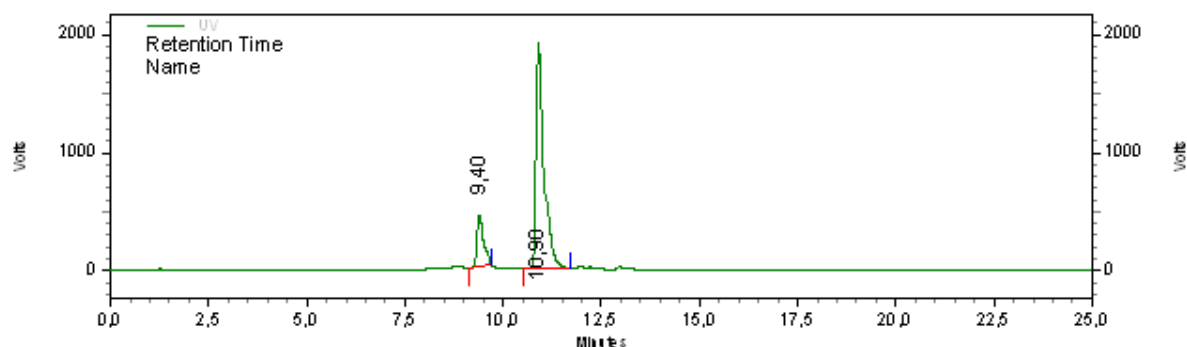
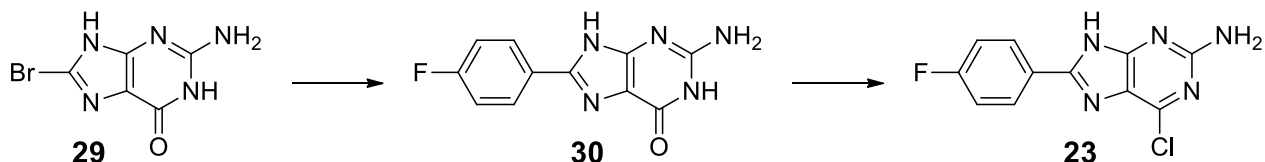


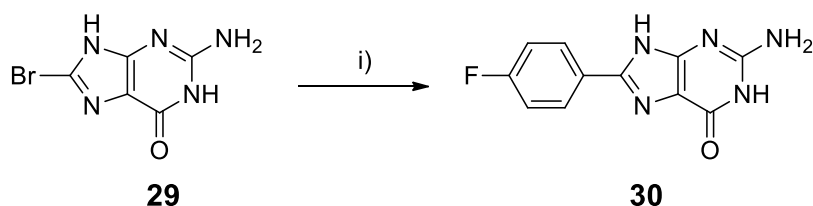
Abbildung 3-9: HPLC-Chromatogramm Versuch a (äquimolares Verhältnis von **22** und **25d**)

Abbildung 3-10: HPLC-Chromatogramm Versuch b (Überschuss **25d**)Alternative Syntheseroute III

BUGGE *et al.* beschreiben während der Suzuki-Kupplung mit 6-Brom-4-chlorthieno[2,3-*d*]pyrimidin ebenfalls das Auftreten unerwünschter bisubstituierter Derivate.<sup>123</sup> In Anlehnung an die Optimierungsversuche dieser Autoren wurde eine dritte alternative Syntheseroute III erarbeitet (Schema 3-10). Diese sollte über 2-Amino-8-brom-1*H*-purin-6-(9*H*)-on (**29**) zur gewünschten Verbindung **23** verlaufen. Hier bietet sich der Vorteil, dass die Suzuki-Kupplung selektiv an der Imidiazolpartialstruktur des Purinderivates erfolgen kann.

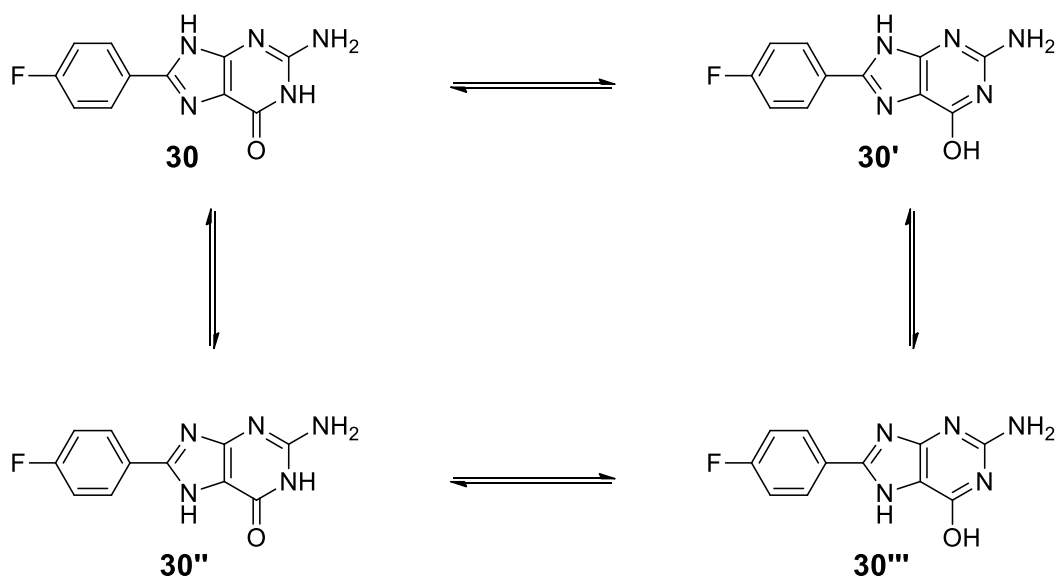
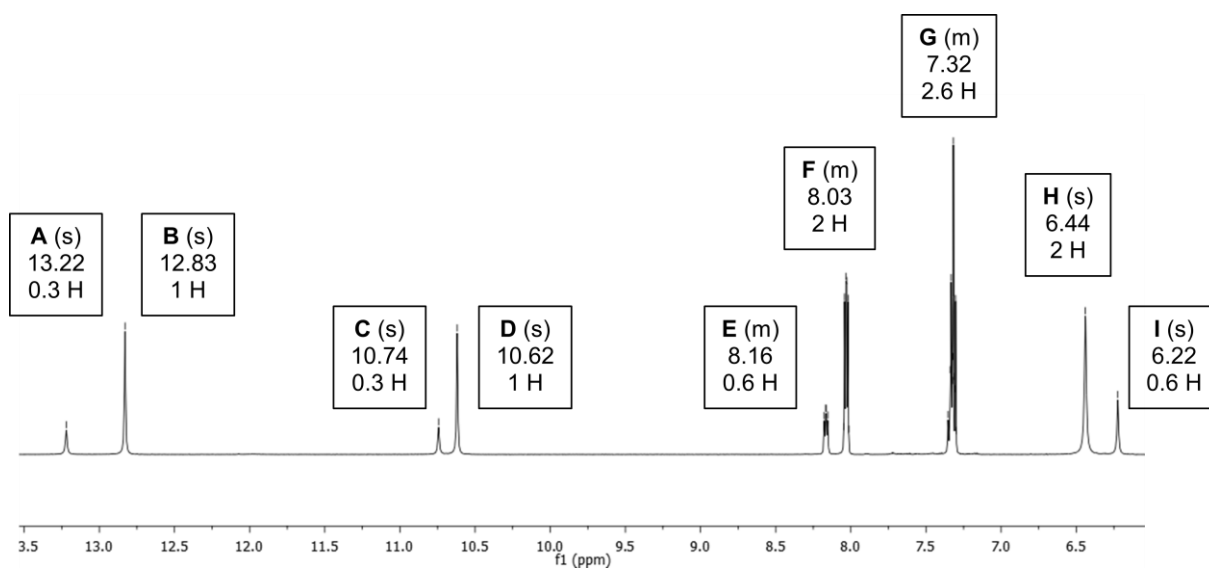
Schema 3-10: Synthesepfad zur alternative Syntheseroute III

Dazu wurde **29** in einer Mikrowellen-gestützten Synthese bei 130 °C mit *p*-Fluorphenylboronsäure unter Zusatz von K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in einem Dioxan/Wasser-Gemisch versetzt, wobei Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> als Katalysator diente. Nach Aufarbeitung konnte Verbindung **30** isoliert werden (Schema 3-11).



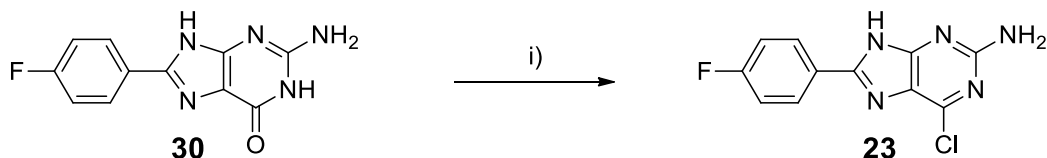
**Schema 3-11:** Synthese von Verbindung **30**: i) *p*-Fluorphenylboronsäure,  $K_2CO_3$ ,  $Pd(PPh_3)_4$ , Dioxan/Wasser 3:1,  $\mu W$ , 130 °C, 1 h

In den NMR-Spektren der Verbindung **30** konnte ein doppelter Signalsatz beobachtet werden, wobei zwei Verbindungen im Verhältnis 1:0.3 vorliegen. Es lässt sich die Vermutung aufstellen, dass es sich bei den beiden Signalsätzen im NMR-Spektrum um tautomere Verbindungen handelt. Hier liegt wahrscheinlich ein Gleichgewicht zwischen der Lactam- (**30**) und der Lactim-Form (**30'**) vor (Schema 3-12). Die Ausbildung dieser tautomeren Formen wurde bereits für Oxopurine, wie Guanin, beschrieben.<sup>109</sup> Dieser Effekt, der sowohl im  $^1H$ - als auch im  $^{13}C$ -NMR-Spektrum zu beobachten ist, wird hier anhand des  $^1H$ -NMR-Spektrums gezeigt (Abbildung 3-11). Da im  $^1H$ -NMR-Spektrum für beide Verbindungen die  $NH_2$ -Gruppe zu sehen ist ( $I = 6.22$  und  $H = 6.44$  ppm), ist davon auszugehen, dass diese nicht an der Tautomerisierung beteiligt ist. Außerdem konnte im Spektrum der Verbindung **23** nur ein Signalsatz beobachtet werden, wobei dort die  $NH_2$ -Gruppe bei einer ähnlichen chemischen Verschiebung auftaucht. Die beiden Verbindungen (**30** und **23**) unterscheiden sich durch die Lactamfunktion, sodass eine Tautomerisierung an dieser Stelle für den doppelten Signalsatz verantwortlich zu sein scheint. Die Signale bei 13.22 ppm und 12.83 ppm sind der  $NH$ -Gruppe der Imidazolpartialstruktur zuzuordnen, da diese bei einer ähnlichen Verschiebung bei der Verbindung **23** wiedergefunden werden kann. Damit sind die Signale bei 10.62 und 10.74 ppm durch die  $NH$ - bzw.  $-OH$ -Gruppe des Lactams oder Lactims zu begründen, wobei eine eindeutige Zuordnung nicht möglich ist. Die Signale E, G und F werden durch die jeweiligen aromatischen Protonen des *p*-Fluorphenylringes verursacht, wobei es im Signal G zu einer Überlagerung zweier Signale kommt. Eine andere mögliche Begründung für die Beobachtung von Tautomeren im NMR-Spektrum wäre das Vorliegen von 7H- und 9H-Isomeren (Schema 3-12).

Schema 3-12: Tautomerisierung der Verbindung **30**Abbildung 3-11: Ausschnitt des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums der Verbindung **30**

Verbindung **30** wurde anschließend in  $\text{POCl}_3$  refluxiert um **23** darzustellen, wobei *N,N*-Dimethylanilin als Hilfsbase diente. Für derartige Chlorierungen findet sich in der Literatur eine Vielzahl an Vorschriften.<sup>124-126</sup> In den Syntheseversuchen zeigte sich, dass der Einsatz der Verbindung **30** als Rohprodukt ohne negativen Einfluss auf den Reaktionsverlauf möglich ist. Zur Entfernung des überschüssigen Phosphoroxychlorides wurde der Ansatz nach beendeter Reaktion langsam auf Eiswasser unter Eiskühlung gegeben und anschließend mit einer  $\text{NH}_3$ -Lösung

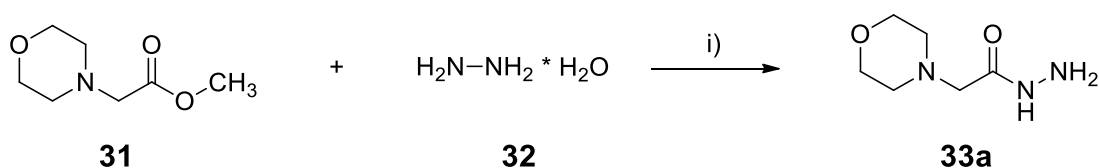
neutralisiert (pH 7 – 8). Die erhaltene wässrige Suspension wurde nach Zugabe von Kieselgel unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt, um das Produkt anschließend mittels Säulenchromatographie aufzureinigen. Damit konnte Verbindung **23** für die Synthese der Testverbindungen bereitgestellt werden (Kapitel 3.5).



Schema 3-13: Synthese von 6-Chlor-8-(4-fluorphenyl)-9*H*-purin-2-amin (**23**): i) POCl<sub>3</sub>, *N,N*-Dimethylanilin, Reflux, 2 h

### 3.3 1,3,4-Oxadiazol-2-thiole

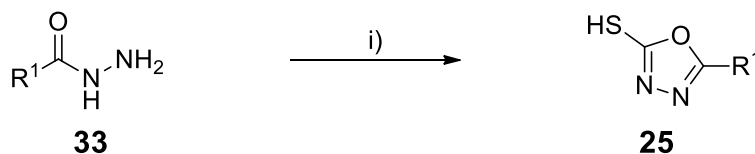
Für die Synthese von 1,3,4-Oxadiazol-2-thiolen, die üblicherweise von Hydraziden ausgeht, existieren etlichen Vorschriften in der Literatur.<sup>127-130</sup> Die Mehrzahl der verwendeten Hydrazide **33** wurde kommerziell erworben; 2-Morpholinoacetohydrazid wurde jedoch aus einem Ester gewonnen. Dazu wurde 2-Morpholinoessigsäuremethylester (**31**) in Methanol mit Hydrazin-Hydrat (**32**) umgesetzt (Schema 3-14).<sup>129, 131</sup>



Schema 3-14: Synthese von 2-Morpholinoacetohydrazid (**33a**): i) Methanol, Reflux, 6.5 h

Zur Synthese der 1,3,4-Oxadiazol-2-thiole **25** wurden die jeweiligen Hydrazide **33** unter Zusatz von KOH in Ethanol gelöst und nach Zugabe von Schwefelkohlenstoff unter Rückfluss erhitzt, wobei es zum Ringschluss und zur Bildung des 1,3,4-Oxadiazol-2-thiols kommt. Zur weiteren Aufarbeitung wurde der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt, unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt und

der erhaltene Feststoff in Wasser suspendiert. Nach Zusatz von verdünnter Salzsäure fiel das entsprechende 1,3,4-Oxadiazol-2-thiol aus. Die Temperatur hat einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der Reaktion. TIPERCIUC *et al.* konnten zeigen, dass es bei 10 °C zur Ausbildung von Kaliumdithiocarbazaten kommt, die isoliert und anschließend mit Schwefelsäure weiter zu 1,3,4-Thiadiazolen umgesetzt werden können.<sup>132</sup> Daher ist es zwingend erforderlich, auf die korrekte Temperatur zu achten.

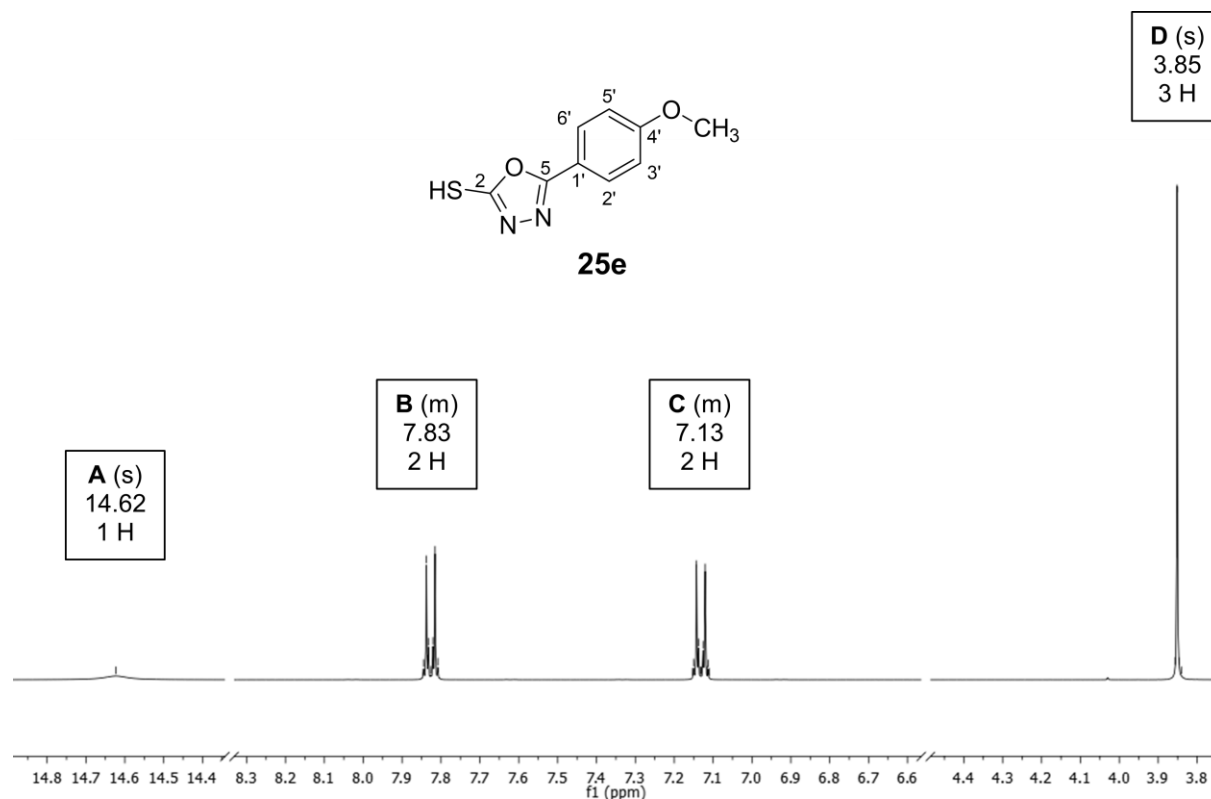


**Schema 3-15:** Synthese der 1,3,4-Oxadiazol-2-thiole **25**: i) Ethanol, KOH, CS<sub>2</sub>, Reflux

**Tabelle 3-2:** Synthetisierte 1,3,4-Oxadiazol-2-thiole **25**

Nr.	R <sup>1</sup>	Ausbeute [%]	Nr.	R <sup>1</sup>	Ausbeute [%]
<b>25a</b>		<b>43</b>	<b>25h</b>		<b>81</b>
<b>25b</b>		<b>68</b>	<b>25i</b>		<b>68</b>
<b>25c</b>		<b>72</b>	<b>25j</b>		<b>36</b>
<b>25d</b>		<b>52</b>	<b>25k</b>		<b>49</b>
<b>25e</b>		<b>62</b>	<b>25l</b>		<b>20</b>
<b>25f</b>		<b>60</b>	<b>25m</b>		<b>48</b>
<b>25g</b>		<b>54</b>			

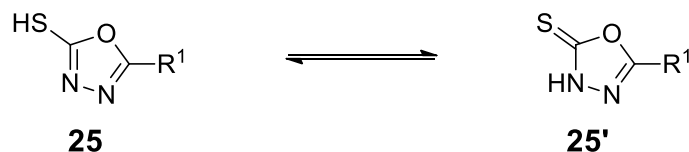
Im Folgenden wird das NMR-Spektrum der Verbindung **25e** als typischem Vertreter dieser Substanzklasse vorgestellt.



**Abbildung 3-12:** Ausschnitt des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums der Verbindung **25e**

Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum sind zwei Multipletts (Signale B und C) für die Protonen des aromatischen Sechsrings zu sehen, die dabei das typische Erscheinungsbild eines *para*-substituierten Aromaten mit einem AA'XX'-Spinsystem zeigen (Abbildung 3-12). Das Singulett D bei 3.85 ppm lässt sich dem Methoxysubstituenten zuordnen. Das sehr breite Signal A bei 14.80 ppm weist ein Integral für ein Wasserstoffatom auf und gehört zu der NH- oder SH-Gruppe. Experimentelle Daten zu diversen 1,3,4-Oxadiazol-2-thiolen sind vielfach in der Literatur beschrieben, wobei häufig berichtet wird, dass es zu einer Tautomerisierung zwischen Thiolactam und Thiolactim kommt, wobei das Gleichgewicht auf der Seite der Thionform **25'** zu liegen scheint (Schema 3-16).<sup>133-136</sup> Dieser Effekt könnte für die starke Verbreiterung des Signals verantwortlich sein. Bei den hier synthetisierten Derivaten **25** konnte allein durch die NMR-Spektren nicht eindeutig zugeordnet werden, um welches Isomer es sich bei den isolierten Verbindungen handelt. Dennoch ist davon auszugehen, dass die

anschließende nucleophile Substitution an den Purinderivaten über das Schwefelatom verläuft, da dies die höhere Nucleophilie aufweist.<sup>136</sup>



Schema 3-16: Tautomerisierung der 1,3,4-Oxadiazol-2-thiole **25**

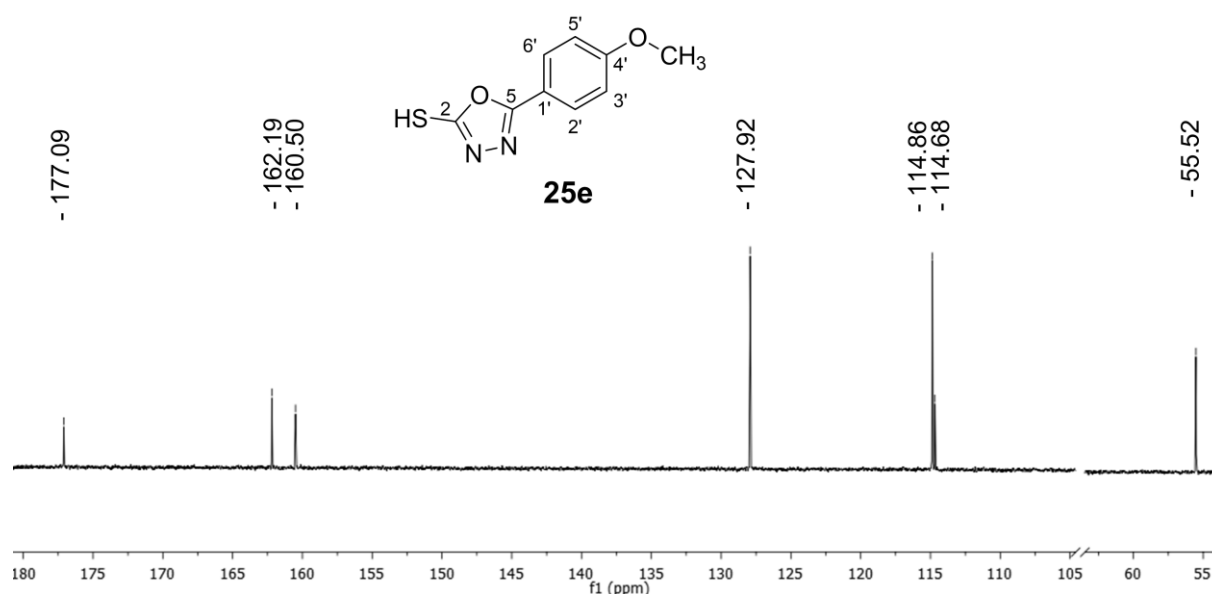


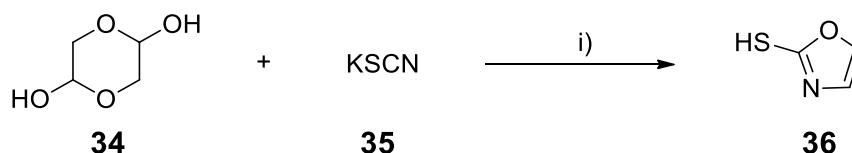
Abbildung 3-13: Ausschnitt des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums der Verbindung **25e**

Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **25e** sind zwei deutlich intensitätsstarke Signale (114.86 und 127.92 ppm) zu erkennen, die von den unsubstituierten Kohlenstoffatomen des Sechsrings stammen. Da jeweils zwei Kohlenstoffatome chemisch äquivalent sind, ergeben sie ein gemeinsames Signal, das im Vergleich zu den anderen deutlich höher ist. Das Signal bei 55.52 ppm lässt sich dem C-Atom der Methoxygruppe zuordnen. Die weiteren Signale werden durch die restlichen Kohlenstoffatome verursacht, wobei das Signal bei 114.68 ppm durch das C1'-Atom und das Signal bei 177.09 ppm durch das C2-Atom verursacht wird. Die Unterscheidung zwischen den C5- und C4'-Signalen ist in diesem Spektrum nicht möglich (Abbildung 3-13).



### 3.4 Oxazol-2-thiol

Neben verschiedenen 1,3,4-Oxadiazol-2-thiolen **25** wurde auch Oxazol-2-thiol (**36**) als Edukt synthetisiert.

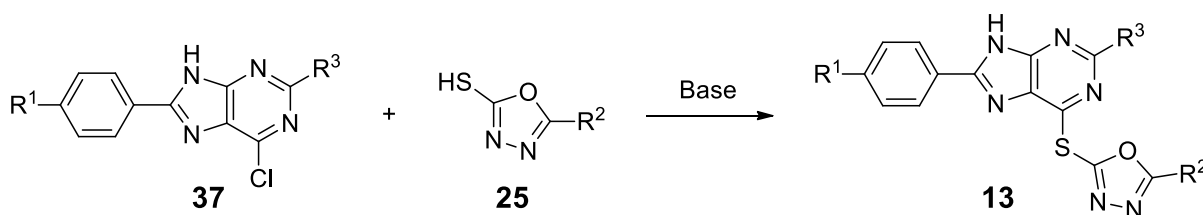


Schema 3-17: Synthese von Oxazol-2-thiol (**36**): i) HCl, Acetonitril

Nach Vorschriften von TEGMEIER *et al.* und WATANABE *et al.* wurde dazu KSCN in Acetonitril gegeben, langsam mit Salzsäure versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene Suspension wurde filtriert und anschließend mit Glycolaldehyddimer zur Bereitstellung des Glykolaldehyds versetzt, sodass nach Erhitzen unter Rückfluss und Aufarbeitung Verbindung **36** isoliert werden konnte (Schema 3-17).<sup>137, 138</sup>

### 3.5 Synthese der Testverbindungen

Die Synthese der Testverbindungen verläuft über eine nucleophile Substitution, bei der das Schwefelatom des 1,3,4-Oxadiazol-2-thiols **25** am Purinderivat **37** angreift und das Chloratom dabei ersetzt. Die Umsetzung erfolgt in einem geeigneten Lösemittel unter Zusatz einer Base, um die Nucleophilie des Schwefelatoms weiter zu erhöhen (Schema 3-18).



Schema 3-18: Synthese der Testverbindungen **13**

Zur Synthese der Testverbindungen wurden verschiedene Methoden erarbeitet, die entweder unter konventionellen Bedingungen oder im Rahmen einer Mikrowellen-gestützten Synthese durchgeführt wurden. Grundlage bildeten dabei die von WÖLFEL beschriebenen Verfahren.<sup>139</sup>

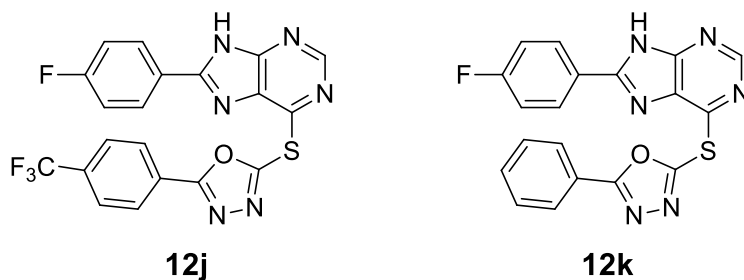
Erste Berichte über die Nutzung von Mikrowellenenergie in der Synthese tauchten in den 1980er Jahren auf.<sup>140, 141</sup> Mikrowellenstrahlung liegt in Bezug auf Wellenlänge und Frequenz zwischen IR- und Radiowellen. Übliche Mikrowellenreaktoren arbeiten bei einer Frequenz von 2.45 GHz, die durch dielektrische Erwärmungseffekte zum Erhitzen des Lösungsmittels führt. Das setzt voraus, dass das jeweilige Lösungsmittel der Reaktion dielektrische Eigenschaften besitzt. Der Verlustfaktor ( $\tan \delta$ ) ist dabei ein Maß dafür, ob eine Substanz elektromagnetische Energie in Wärme umwandeln kann. Polare Lösungsmittel, die die Mikrowellenstrahlung besonders gut absorbieren können und zu einem schnellen Erhitzen des Ansatzes führen, weisen große  $\tan \delta$  Werte ( $\tan \delta > 0.5$ ) auf. Unpolare Materialien, wie Glasgeräte, zeigen nur eine geringe Interaktion mit der Mikrowellenstrahlung, weshalb man hier von einer Transmission der Strahlung spricht. Die dielektrischen Erwärmungseffekte lassen sich durch die dipolaren Eigenschaften von Molekülen erklären. Dipolare Moleküle richten sich in dem Feld aus, das durch die Mikrowellenstrahlung entsteht. Da dieses oszillierend ist, rotieren auch die Moleküle, was zu Reibung und Dielektrizitätsverlust führt. Dies resultiert letztendlich in der Entstehung von Wärme.<sup>142</sup> Erst die Wechselwirkung zwischen Mikrowellenstrahlung und Lösungsmittel führt zu einem Erhitzen des Systems, sodass die Erwärmung von innen zu Stande kommt und sehr gleichmäßig ist. Beim konventionellen Erhitzen kommt der Wärmeeintrag von außen zustande, sodass in den Außenbereichen häufig höhere Temperaturen beobachtet werden. Außerdem wird bei einem Mikrowellen-System die gewünschte Temperatur wesentlich schneller erreicht und es kommt auch insgesamt zu einer Zeitersparnis, da viele Reaktionen kürzere Zeit beanspruchen. Durch das Arbeiten in geschlossenen Gefäßen können Temperaturen weit über dem Siedepunkt des Lösungsmittels erreicht werden. Weiterhin ist vorteilhaft, dass verschiedene Reaktionsbedingungen einfach getestet und variiert werden können. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Gerät (CEM Discover) kann nach dem Entfernen der Mikrowellenstrahlung das System durch einen Luftstrom schnell abgekühlt werden, sodass für eine anschließende Aufarbeitung kürzere Wartezeiten entstehen. Die Temperaturmessung und die Temperaturkontrolle des

Ansatzes verlaufen über einen IR-Sensor. Desweiteren ist ein Magnetrührer integriert, der für eine Durchmischung des Reaktionsansatzes sorgt.<sup>140-142</sup> Mikrowellensysteme bieten daher vielfältige Vorteile in der organischen Synthese. Sowohl die oben beschriebene Suzuki-Kupplung als auch nucleophile Substitutionen sind in der Literatur als Mikrowellen-gestützte Synthesen vielfach beschrieben.<sup>142-145</sup>

Anhand der Verbindung **12j** und **12k** sollen die konventionelle und die Mikrowellen-gestützte Synthese verglichen werden (Tabelle 3-3). Bei der konventionellen Synthese der Verbindung **12j** wurden die Edukte unter Zusatz von Triethylamin in Propan-2-ol gegeben und unter Rückfluss erhitzt. Zu Beginn der Reaktion bildete sich eine Lösung; mit zunehmender Reaktionszeit fiel ein Feststoff aus. Nach 15 h wurde die Reaktion beendet und der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt. Die erhaltene Suspension wurde abgesaugt und der Feststoff durch Umkristallisation aufgereinigt. Die Lösung konnte verworfen werden, da das Produkt zum überwiegenden Teil ausgefallen war. Im Vergleich dazu wurde Verbindung **12k** über eine Mikrowellen-gestützte Synthese bei 120 °C und einer Reaktionszeit von nur 30 min gewonnen. Nach beendeter Reaktion wurde der Ansatz auf Wasser gegeben, wobei ein Feststoff ausfiel, der ebenfalls abgesaugt und durch Umkristallisation aufgereinigt wurde. Es fällt auf, dass mit der Mikrowellenreaktion in diesem Fall eine sehr deutliche Reduzierung der Reaktionszeit erreicht werden konnte. Die Ausbeute und die Reinheit der Rohprodukte (97% und 96%) sind bei beiden Methoden vergleichbar. Aufgrund der großen Zeitersparnis ist die Synthese in der Mikrowelle vorzuziehen, da die Synthese auf konventionelle Weise in Hinblick auf Reinheit und Ausbeute keinen entscheidenden Vorteil bietet.

Bei der Synthese der einzelnen Testverbindungen ergaben sich abweichende Reaktionszeiten, sodass in jedem Fall individuell anhand von DC-Verlaufskontrollen das Ende der Reaktion bestimmt wurde. In den meisten Fällen konnten Rohprodukte mit Reinheiten von >90% gewonnen werden.

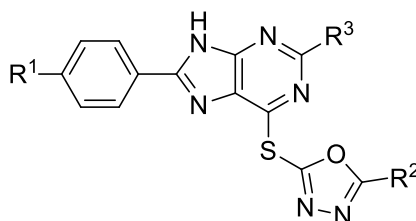
**Tabelle 3-3:** Vergleich der konventionellen Synthese (Verbindung **12j**) und der Mikrowellen-gestützten Synthese (Verbindung **12k**)



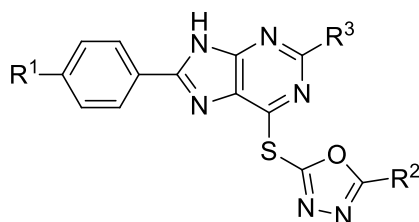
	<i><b>konventionell</b></i>	<i><b>Mikrowellen-gestützt</b></i>
<u>Reaktionsbedingungen</u>		
Lösungsmittel:	Propan-2-ol	DMF
Base:	Triethylamin	Triethylamin
Temperatur:	Reflux	120 °C
Reaktionszeit	<b>15 h</b>	<b>30 min</b>
Reinheit des Rohproduktes	97%	96%
Rohausbeute	81%	91%

Die folgenden Verbindungen konnten entweder über die konventionelle oder die Mikrowellen-gestützte Methode dargestellt werden (Tabelle 3-4). Detaillierte Angaben zu der Synthese der einzelnen Testverbindungen finden sich unter den experimentellen Daten (Kapitel 8).

**Tabelle 3-4:** Übersicht über die synthetisierten Testverbindungen; Methode: MW = Mikrowellen-gestützt; K = konventionell



Nr.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Methode	Ausbeute [%]
<b>12a</b>	OCH <sub>3</sub>	4-Cl-Phenyl	H	K	45
<b>12b</b>	F	4-Cl-Phenyl	H	MW	51
<b>12c</b>	H	4-Cl-Phenyl	H	MW	32
<b>12d</b>	OCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> -Phenyl	H	MW	60
<b>12e</b>	OCH <sub>3</sub>	4-OCH <sub>3</sub> -Phenyl	H	K	44
<b>12f</b>	OCH <sub>3</sub>	4-CF <sub>3</sub> -Phenyl	H	K	39
<b>12g</b>	OCH <sub>3</sub>	2-Cl-Phenyl	H	K	50
<b>12i</b>	OCH <sub>3</sub>	<i>tert</i> -Butyl	H	MW	29
<b>12j</b>	F	4-CF <sub>3</sub> -Phenyl	H	K	48
<b>12k</b>	F	Phenyl	H	MW	66
<b>12l</b>	F	4-OCH <sub>3</sub> -Phenyl	H	K	28
<b>12m</b>	OCH <sub>3</sub>	2-CH <sub>3</sub> -Phenyl	H	MW	25
<b>12n</b>	OCH <sub>3</sub>	2,4-di-Cl-Phenyl	H	MW	11
<b>12o</b>	OCH <sub>3</sub>	Benzyl	H	MW	27
<b>12p</b>	OCH <sub>3</sub>	4-Pyridyl	H	MW	72
<b>12q</b>	OCH <sub>3</sub>	4-OH-Phenyl	H	MW	21
<b>12r</b>	OCH <sub>3</sub>	Morpholinomethyl	H	K	18
<b>12s</b>	H	4-CH <sub>3</sub> -Phenyl	H	MW	46
<b>12t</b>	H	4-OCH <sub>3</sub> -Phenyl	H	MW	41



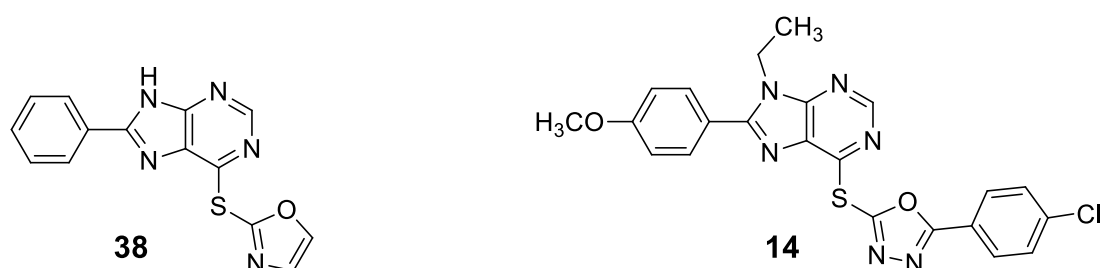
Nr.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Methode	Ausbeute [%]
<b>12u</b>	H	4-CF <sub>3</sub> -Phenyl	H	MW	49
<b>12v</b>	H	2-Cl-Phenyl	H	MW	62
<b>12w</b>	H	Phenyl	H	MW	18
<b>12x</b>	H	2,4-di-Cl-Phenyl	H	MW	10
<b>12y</b>	H	Benzyl	H	MW	27
<b>12z</b>	H	4-Pyridyl	H	K	41
<b>12aa</b>	H	Furyl	H	MW	40
<b>12ab</b>	F	2-Cl-Phenyl	H	K	63
<b>12ac</b>	F	2,4-di-Cl-Phenyl	H	MW	53
<b>12ad</b>	F	4-Pyridyl	H	K	65
<b>13a</b>	F	4-Cl-Phenyl	NH <sub>2</sub>	MW	44
<b>13b</b>	F	2,4-di-Cl-Phenyl	NH <sub>2</sub>	MW	36

Die bereits in Kapitel 3.2 beschriebenen Verbindungen (**15a-c**) konnten ebenfalls in einer Mikrowellen-gestützten Synthese gewonnen werden (Tabelle 3-5). Sie dienen dazu, den Einfluss des Substituenten an Position 8 der Purinpartialstruktur zu untersuchen.

**Tabelle 3-5:** synthetisierte Testverbindungen, die an der Position 8 der Purinpartialstruktur unsubstituiert sind; Methode: MW = Mikrowellen-gestützt

Nr.	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Methode	Ausbeute [%]
<b>15a</b>	4-Cl-Phenyl	NH <sub>2</sub>	MW	74
<b>15b</b>	4-CF <sub>3</sub> -Phenyl	NH <sub>2</sub>	MW	61
<b>15c</b>	2-Cl-Phenyl	NH <sub>2</sub>	MW	67

Die Derivate **38** und **14** wurden auch über die oben beschriebene nucleophile Substitution synthetisiert, wobei Verbindung **38** statt einer Oxadiazolpartialstruktur ein unsubstituiertes Oxazol enthält, was weiteren Aufschluss über den Einfluss des Substitutionsmusters auf die Aktivität der Substanzen geben sollte. Die an Position N(9) alkylierte Verbindung **14** diente dazu, die Relevanz der Interaktionen zur *hinge*-Region zu überprüfen. Wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, wird der Bindemodus der Substanz erheblich beeinträchtigt, sodass ein Aktivitätsverlust zu erwarten war.



**Schema 3-19:** Testverbindungen **38** (Methode: MW, Ausbeute 29%) und **14** (Methode: MW, Ausbeute 46%)

Im Folgenden wird ein typisches NMR-Spektrum dieser Substanzklasse mit der Grundstruktur **12** anhand der Verbindung **12I** erläutert. Abbildung 3-14 zeigt das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum dieser Verbindung, wobei der aromatische Bereich in Abbildung 3-15 detaillierter dargestellt wird (Ausschnitt A). Bei 3.85 ppm ist ein Singulett (G) zu sehen, das ein Integral für 3 Wasserstoffatome aufweist und dem Methoxysubstituenten zuzuordnen ist. Die NH-Gruppe des Puringrundkörpers gibt ein sehr breites Singulett bei 14.23 ppm, was wahrscheinlich mit dem Effekt der Tautomerisierung zwischen N(9)-H- und N(7)-H-Purin zusammen hängt, der bereits in Kapitel 3.1 beschrieben wurde.

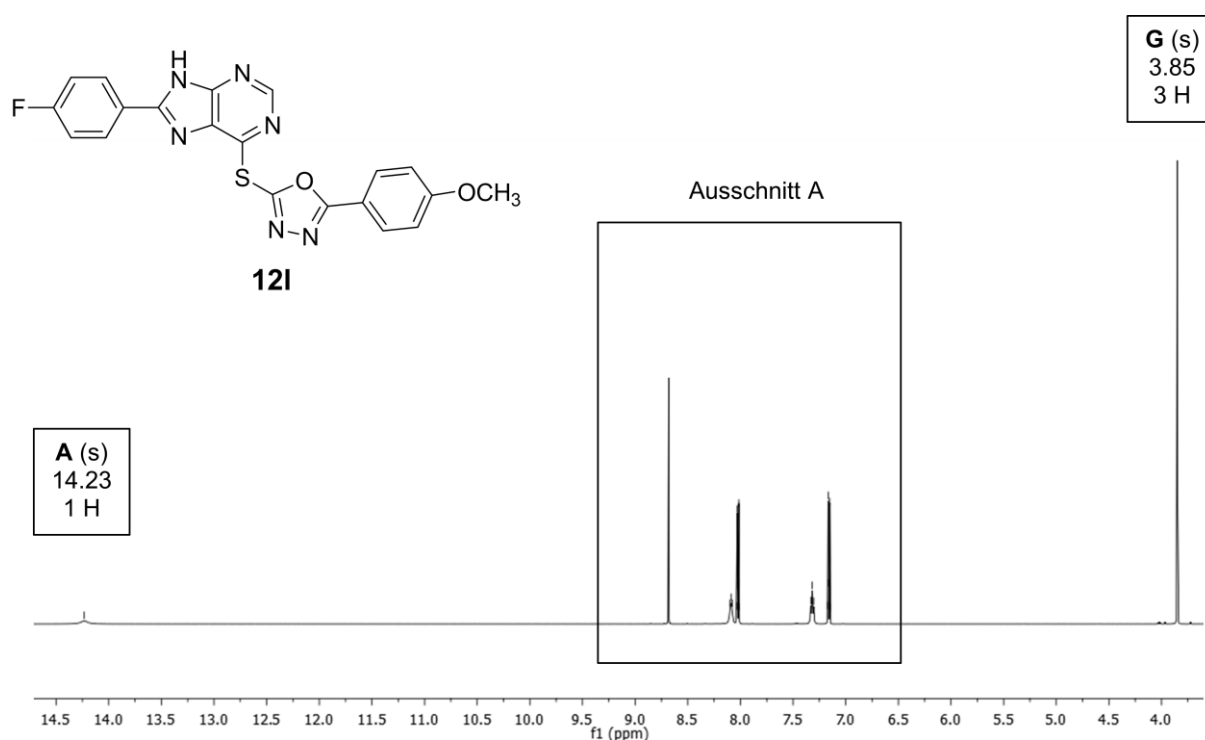
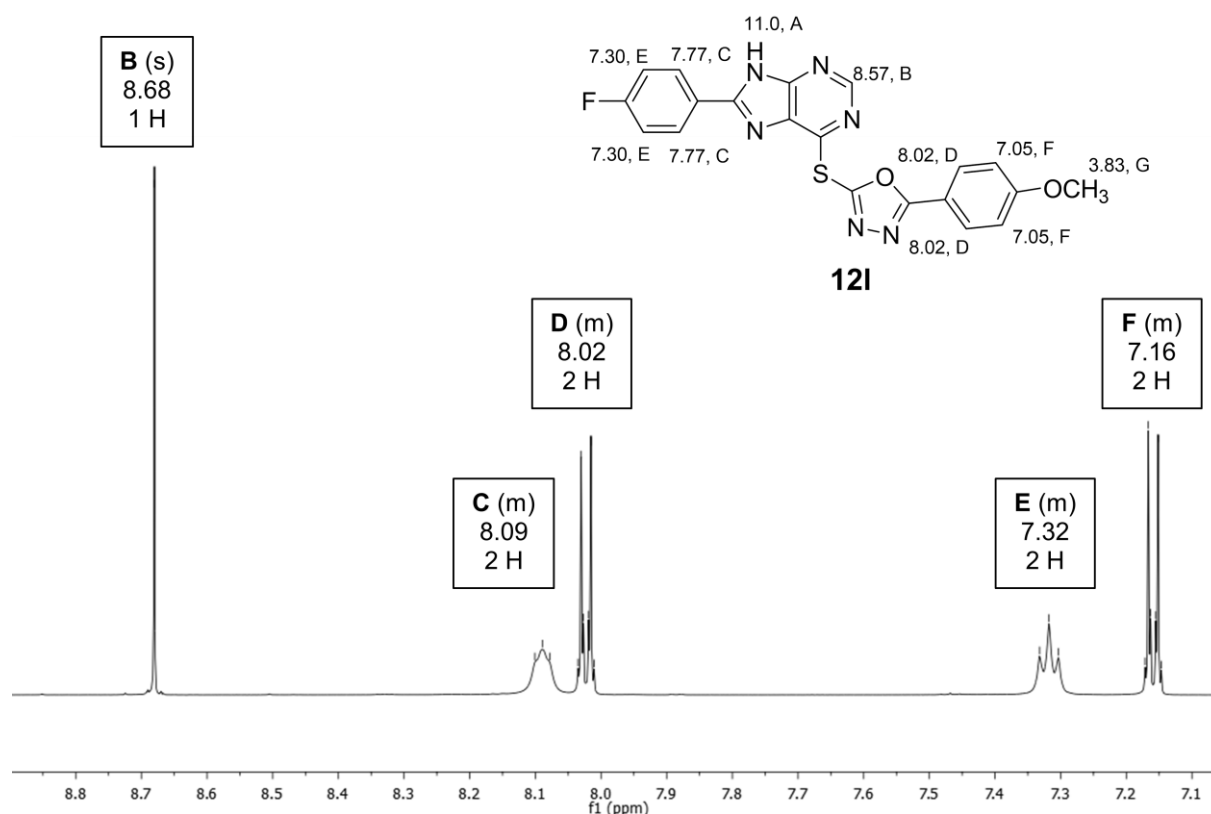


Abbildung 3-14: Ausschnitt des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums der Verbindung **12I**

Abbildung 3-15 zeigt den aromatischen Bereich (Ausschnitt A) des Spektrums, mit einem Singulett bei 8.68 ppm, das durch die CH-Gruppe des Puringrundkörpers verursacht wird. Weiterhin sind vier Multipletts zu sehen, die jeweils ein Integral für zwei Wasserstoffatome aufweisen und sich den beiden aromatischen Sechsringen zuordnen lassen. Die Signale C und E sind auffallend breit. Hier liegt die Vermutung nahe, dass diese Signale durch den *p*-Fluorphenylsubstituenten an der Purinpartialstruktur verursacht werden. Wie bereits oben beschrieben, führt die Tautomerisierung des Purins zu einer Signalverbreiterung. Außerdem bewirkt die Kopplung zum benachbarten Fluoratom ein typisches Kopplungsmuster. Das Signal



E lässt sich aufgrund der chemischen Verschiebung und des Kopplungsmusters den Wasserstoffatomen zuordnen, die in *ortho*-Position zum Fluorsubstituenten stehen. Damit ergeben die Wasserstoffatome des *p*-Methoxyphenylsubstituenten an der Oxadiazolpartialstruktur die Signale D und F. Hier zeigt sich wiederum das typische Aufspaltungsmuster eines *para*-substituierten Aromaten. Aufgrund der chemischen Verschiebung lässt sich vermuten, dass das Signal F durch die Wasserstoffatome verursacht wird, die in *ortho*-Position zum Methoxysubstituenten stehen, da dieser Substituent zu einer Hochfeldverschiebung führt. Das gemessene  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ist in guter Übereinstimmung mit dem von ChemBioDraw<sup>146</sup> vorhergesagten Spektrum. Die Werte dieser Vorhersage sind in Abbildung 3-15 als chemische Verschiebung in ppm an der Struktur angegeben. Besonders gut stimmen die Werte für die Wasserstoffatome des aromatischen Ringes an der Oxadiazolpartialstruktur überein, was eine weitere Begründung für die Zuordnung der Signale ist.



**Abbildung 3-15:** Ausschnitt A des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums der Verbindung **12I**; Die Zahlenwerte an der Struktur **12I** geben die chemische Verschiebung in ppm des von ChemBioDraw vorhergesagten<sup>146</sup> Spektrums an.

Abbildung 3-16 zeigt einen Ausschnitt des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums der Verbindung **12I**, wobei zwei Bereiche (Ausschnitt A und B) im Detail in Abbildung 3-17 und Abbildung 3-18 gezeigt werden. Das Signal bei 55.59 ppm wird durch das aliphatische Kohlenstoffatom der  $\text{CH}_3$ -Gruppe verursacht. Die aromatischen H-substituierten Kohlenstoffatome geben Signale bei 115.06, 116.19, 128.77, 129.56 und 151.54 ppm. Die Signale C bei 116.19 und A 129.56 spalten jeweils in Dubletts auf, da es hier zu einer Kopplung mit dem benachbarten Fluoratom kommt. Das Signal C mit der größeren Kopplungskonstante (22.10 Hz) wird dabei durch die beiden Kohlenstoffatome, die sich in *ortho*-Stellung zum Fluoratom befinden, verursacht. Aufgrund ihrer höheren Intensitäten lassen sich die Signale bei 115.06 und 128.77 ppm den jeweils zwei C-Atomen der 2',6'- und 3',5'-Positionen des 4-Methoxyphenylringes zuordnen. Das Signal bei 151.54 ppm entspricht damit dem Kohlenstoffatom der CH-Gruppe des Puringrundkörpers. Die restlichen Signale werden durch die aromatischen Kohlenstoffatome ohne H-Substitution verursacht. Auf eine vollständige Zuordnung der einzelnen Signale wurde hier verzichtet, da dafür aufwendige 2D-NMR-Spektren erforderlich gewesen wären. Zwei der Signale (B und D) zeigen eine Aufspaltung in Dubletts, sodass sich diese den Kohlenstoffatomen des p-Fluorphenylsubstituenten zuweisen lassen. Dabei zeigt das C-Atom, das den Fluorsubstituenten trägt, mit 250.1 Hz die größere Kopplungskonstante (Signal D). Weiterhin fällt auf, dass die Signale bei 130.95, 152.47 und 153.00 ppm sehr klein und breit sind. Vermutlich werden diese durch die Kohlenstoffatome der Purinpartialstruktur verursacht und bedingt durch die Tautomerisierung stark verbreitert. Eines der Kohlenstoffatome konnte im Spektrum der Verbindung **12I** nicht detektiert werden. Dies könnte zum einen damit zusammenhängen, dass das Signal zu breit für eine Detektion ist. Zum anderen wäre denkbar, dass sich bei den Signalen bei 152.47 oder 153.00 zwei Signale überlagern, da in den Spektren anderer Testverbindungen in diesem Bereich drei Signale beobachtet werden konnten.

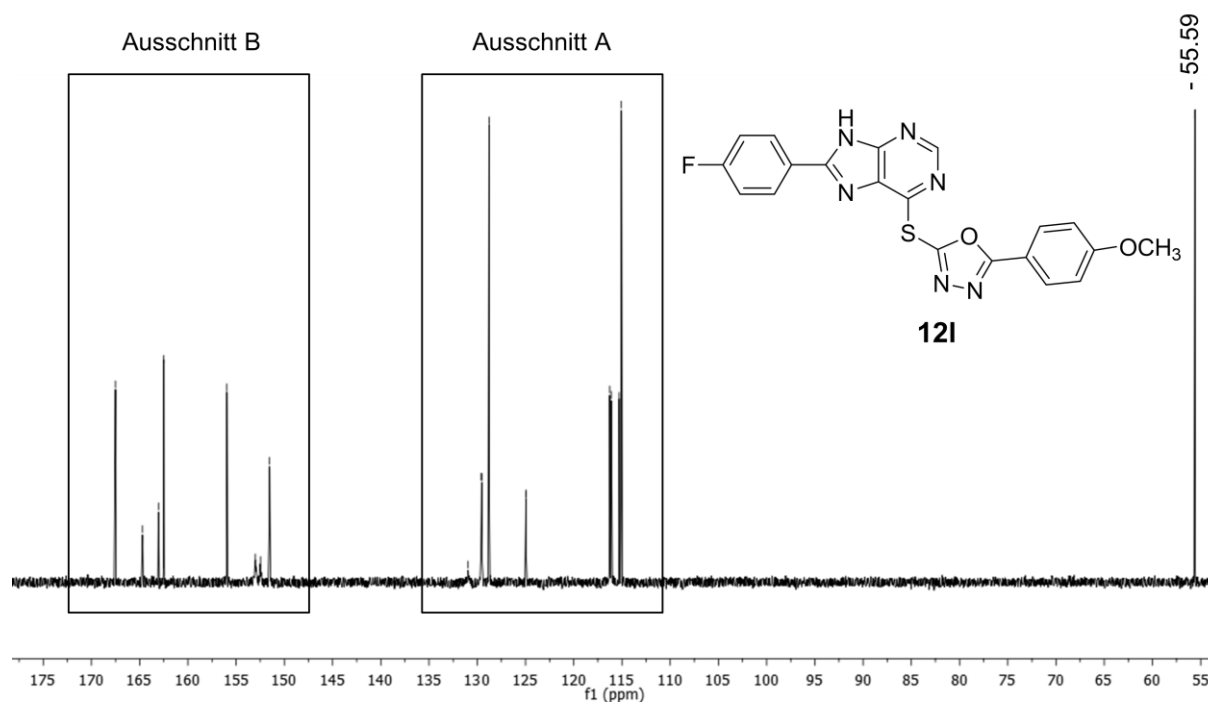


Abbildung 3-16: Ausschnitt des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums der Verbindung **12I**

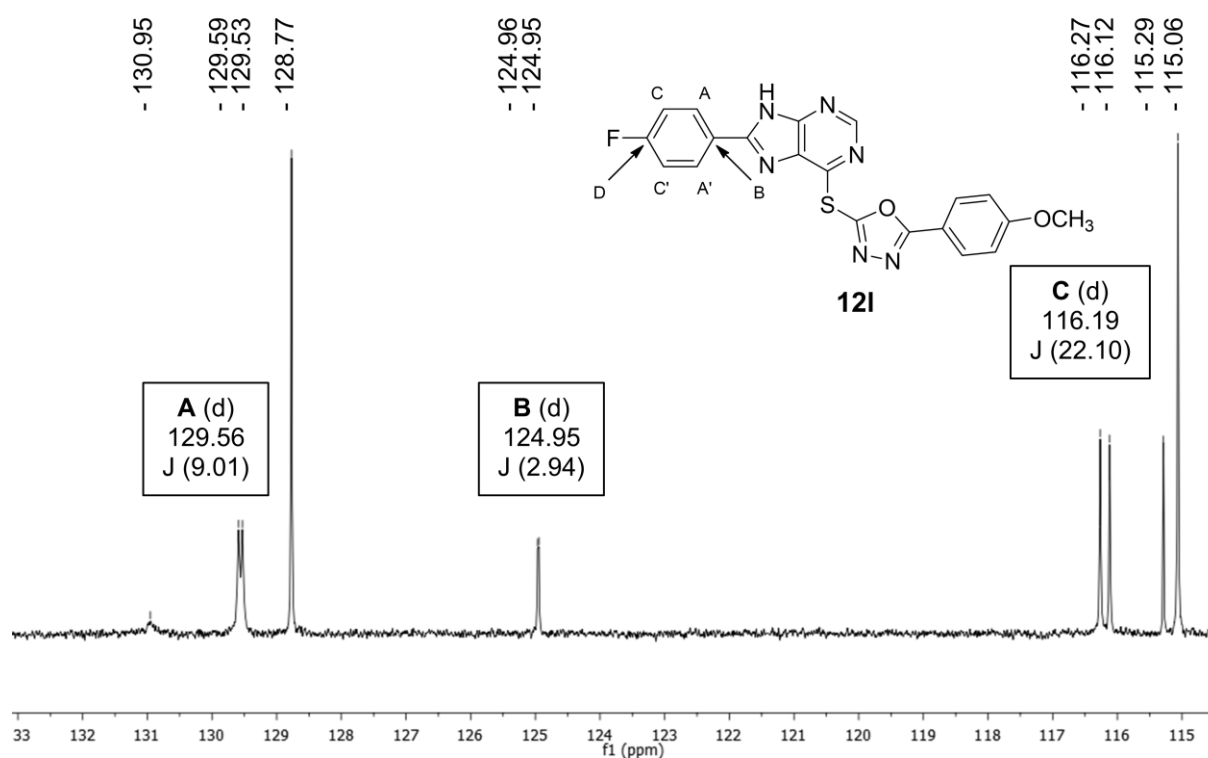
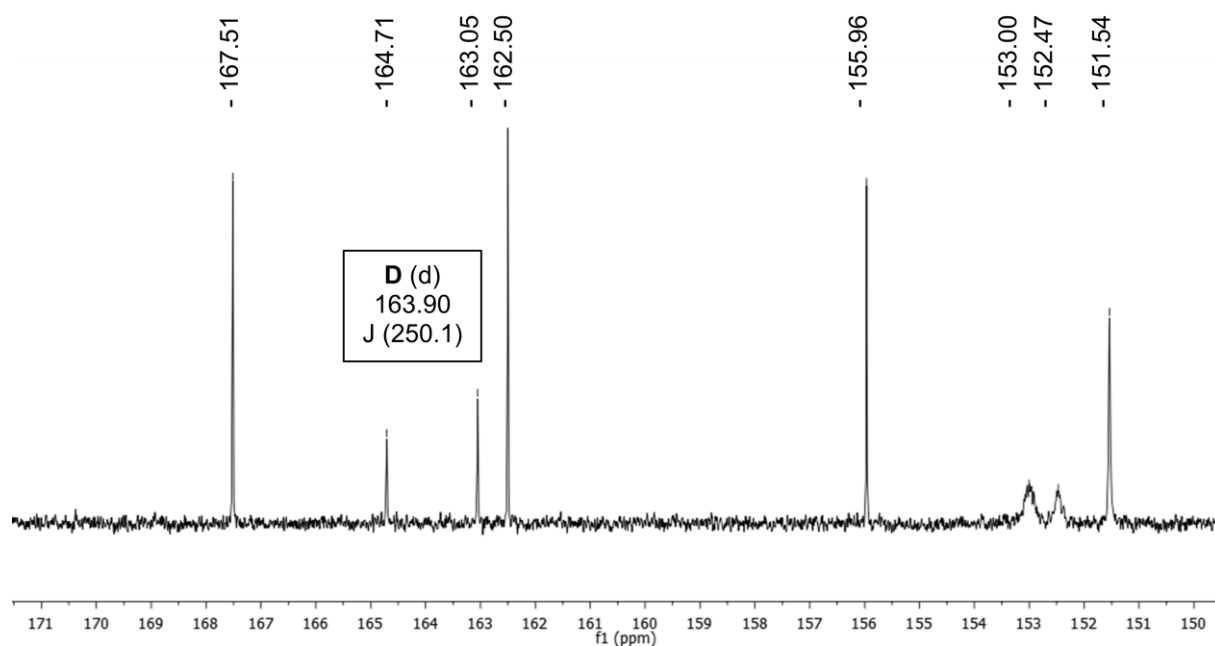


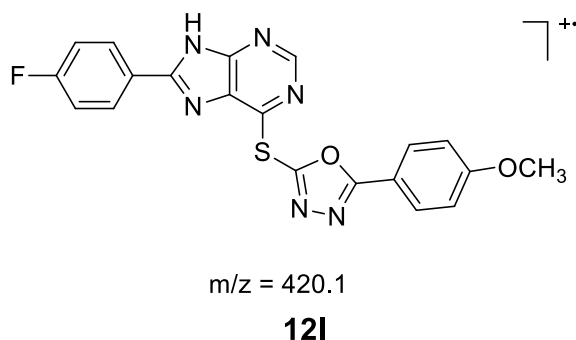
Abbildung 3-17: Ausschnitt A des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums der Verbindung **12I**. Markiert sind die durch Kopplung mit Fluor aufgespaltenen Signale der Kohlenstoffatome A, B und C.



**Abbildung 3-18:** Ausschnitt B des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums der Verbindung **12I**. Markiert ist das durch Kopplung mit Fluor aufgesplante Signal des Kohlenstoffatoms D.

### 3.6 Massenspektrometrische Besonderheiten

Die Massenspektren der Testverbindungen zeigen charakteristische Fragmentierungen, die am Beispiel der Verbindung 2-[[8-(4-Fluorphenyl)-9*H*-purin-6-yl]thio}5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazol (**12I**) diskutiert werden sollen. Es wurden jeweils EI-Spektren angefertigt. Die Fragmentierung geht in diesem Fall vom Molekölion mit einem Signal bei 420.1 aus (Schema 3-20). Weitere charakteristische Signale wurden im Spektrum mit Pfeilen markiert (Abbildung 3-19).



Schema 3-20: Molekölion der Verbindung **12I**

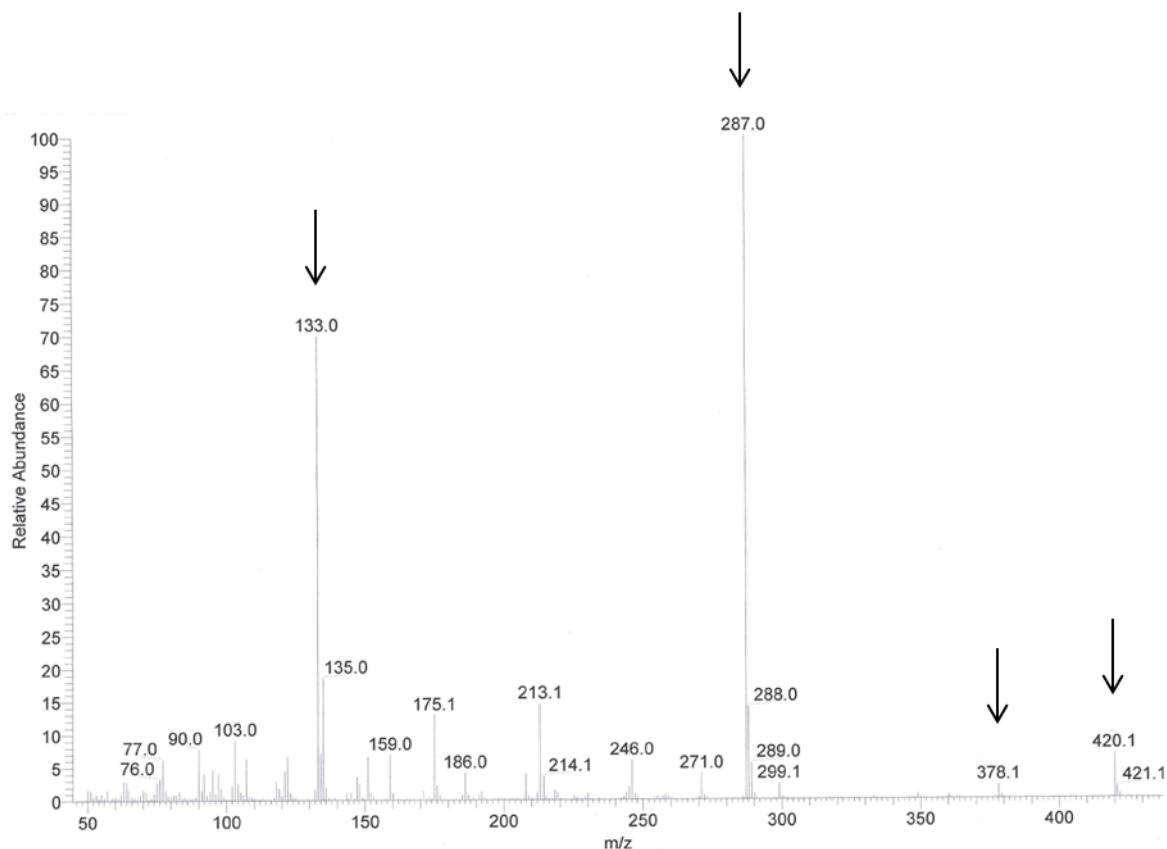
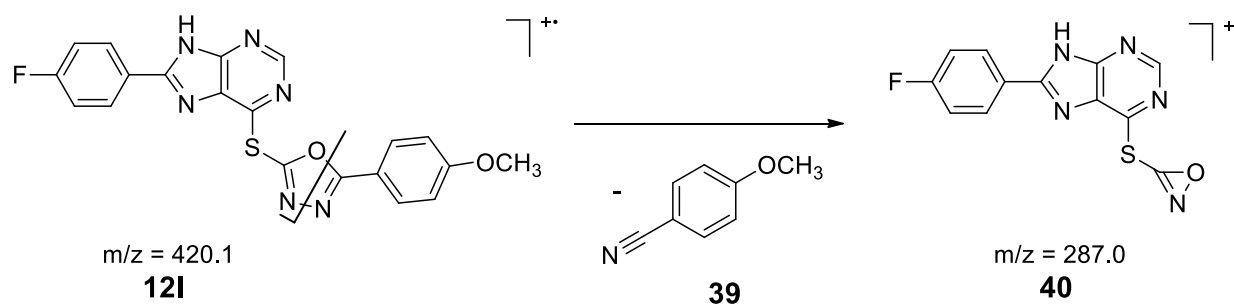


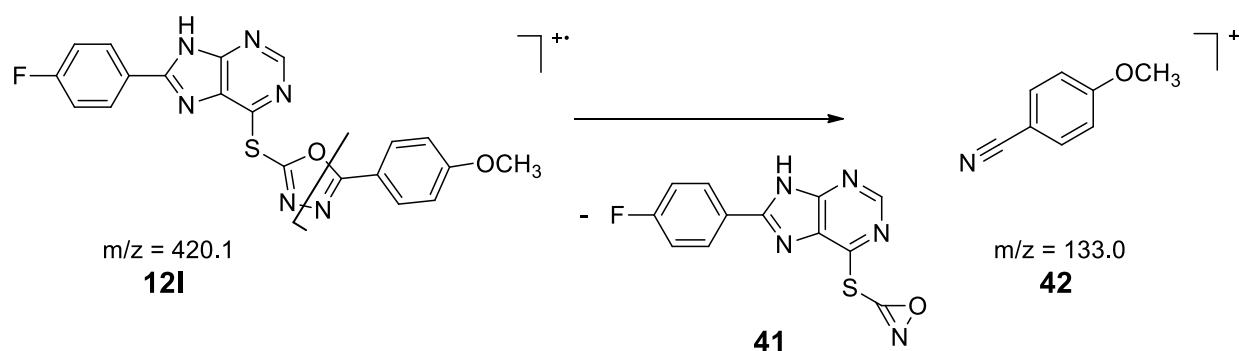
Abbildung 3-19: EI-MS-Spektrum der Verbindung **12I**

Der Basispeak (100%) ist in diesem Fall der Peak bei 287.0. Bei diesem Fragment erfolgt vermutlich eine Spaltung des Molekülions an der Oxadiazolpartialstruktur (Schema 3-21). Diese Fragmentierung wurde bei nahezu allen Testverbindungen mit dieser Grundstruktur beobachtet und kann daher als dafür charakteristisch erachtet werden. Auf Grundlage der Ausführungen von HASAN *et al.* wird für die Fragmentierung der in Schema 3-21 gezeigte Ablauf postuliert.<sup>147</sup> Der senkrechte Strich gibt dabei an, welche Bindungen gespalten werden, während der waagrechte Strich anzeigt, auf welcher Seite die Ladung verbleibt. Nach Abspaltung des Nitrils **39** verbleibt Verbindung **40** als Radikalkation und verursacht den Peak bei 287.0. Zusätzlich wurde von diesem Peak eine hochaufgelöste Masse angefertigt, die die beschriebene Vermutung unterstützt (HRMS (EI):  $m/z$   $[M]^{+•}$  ber. 287.02716, gef. 287.02753).



Schema 3-21: Ausbildung des Basispeaks bei  $m/z = 287.0$

Zudem wird bei einigen Testverbindungen eine weitere Fragmentierung an der oben genannten Stelle beobachtet, wobei der andere Molekülteil als Fragmention zurück bleibt (Schema 3-22), was auch bereits von HASAN *et al.* beschrieben wurde.<sup>147</sup> Dabei verbleibt ein Nitril als Radikalkation **42**, während Verbindung **41** als Neutralteilchen eliminiert wird (Schema 3-22).



Schema 3-22: Ausbildung des Fragmentpeaks bei  $m/z = 133.0$

Ein weiteres Charakteristikum dieser Substanzklasse ist das Auftreten eines  $M^{+}-42$  Signals, das SPARKMANN *et al.* als charakteristisch für Purine benennen.<sup>148</sup> Im vorliegenden Fall tritt tatsächlich ein Signal bei 378.1 auf. Verschiedene Autoren beschreiben bei Purinderivaten die Abspaltung von Cyanamid, was zu einem  $M^{+}-42$  Signal führen würde.<sup>149-152</sup> Die Hochauflösung dieses Signals konnte die Abspaltung von Cyanamid jedoch nicht bestätigen. In den Massenspektren der Purinderivate **18**, die im Rahmen dieser Arbeit als Zwischenstufen synthetisiert worden waren, wurden entsprechende  $M^{+}-42$ -Signale nicht beobachtet. Die An- oder Abwesenheit dieser Signale in den Massenspektren scheint daher kein zwangsläufiges Kriterium für das Vorliegen einer Purinstruktur darzustellen.

### 4. Biologische Aktivität

Die biologische Testung der Substanzen wurde von der Firma ProQinase GmbH (Freiburg) in einem radiometrischen Proteinkinase-Assay durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung des Assays befindet sich in Kapitel 8.5. Neben ALK *wt* erfolgte eine Testung an verschiedenen Mutanten der ALK, wie ALK L1196M, C1156Y, F1174L, F1174S und R1275Q. Zudem wurde die Aktivität an NPM1-ALK und dessen mutierter Form NPM1-ALK F1174L bestimmt. Eine Testung an FAK und AXL wurde durchgeführt, weil die Hitstruktur aus dem HTS, das diesem Projekt zugrunde liegt, ebenfalls eine Inhibition dieser Kinasen zeigte. Außerdem ist eine Aktivitätsbestimmung an cMet relevant, da der ALK-Inhibitor Crizotinib ein dualer Inhibitor von cMet und ALK ist und sich somit die Selektivitäten vergleichen lassen. Weiterhin wurde in einigen Fällen die Aktivität an anderen tumorrelevanten Kinasen getestet. Die in diesem Kapitel genannten  $IC_{50}$ -Werte für Crizotinib stammen aus Testserien, bei denen neben den synthetisierten Verbindungen auch Crizotinib als Referenzsubstanz mitvermessen wurde.

Bestimmt wurden jeweils  $IC_{50}$ -Werte, die die Konzentration einer Substanz angeben, die nötig ist um die Aktivität eines Enzyms um 50% zu reduzieren. Dabei wird von einer guten Inhibition gesprochen, wenn der  $IC_{50}$ -Wert unterhalb von 10  $\mu M$  liegt, während Verbindungen, die  $IC_{50}$ -Werte  $> 100 \mu M$  aufweisen, als inaktiv bezeichnet werden. Aus dem Vergleich der einzelnen Aktivitätsdaten und dem Bezug zu den *docking*-Untersuchungen lassen sich Hypothesen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen aufstellen. Detaillierte Angaben zu allen Aktivitätsdaten finden sich in Kapitel 8.5.

#### 4.1 Aktivitäten der Testsubstanzen

Tabelle 4-1 zeigt die Inhibitionswerte von einigen der aktivsten Verbindungen. Es wurde jeweils  $R^1$  oder  $R^2$  variiert, sodass verschiedene Reihen (a – h) zu Stande kommen. Da die Strukturen innerhalb einer Reihe jeweils nur an einer Position verändert wurden, lassen sich die Aktivitäten miteinander vergleichen.



In der Reihe d wurde an R<sup>2</sup> ein *p*-Methoxyphenylrest angefügt. Die unterschiedliche Variation an R<sup>1</sup> hat in diesem Fall nur geringe Auswirkungen auf die Inhibition der ALK *wt*, da die Aktivitäten für alle drei Substanzen (**12t**, **12e** und **12l**) auf einem vergleichbaren Niveau liegen (IC<sub>50</sub>-Werte: 4.29 – 4.98 µM). Durch Einfügen eines *p*-Trifluormethylphenylrestes (R<sup>2</sup>) an der Oxadiazolpartialstruktur konnte die Aktivität deutlich gesteigert werden (Reihe e), wobei Verbindung **12u** in dieser Reihe die stärkste Inhibition der ALK zeigt. Interessant ist ein Vergleich der Reihen f und g. Die Derivate mit dem *p*-Chlorsubstituenten zeigen in allen drei Fällen bessere Aktivitäten als ihre *o*-Analoga. In beiden Reihen sind die Derivate **12g**, **12ab**, **12a** und **12b**, die einen *p*-Methoxy- oder einen *p*-Fluorsubstituenten an R<sup>1</sup> tragen, deutlich aktiver als die unsubstituierten Analoga. Für die Derivate **12x** und **12n** führt die Kombination aus *o*- und *p*-Chlorsubstituenten nochmals zu einer Steigerung der Aktivität (Reihe h). Auffällig ist hier die Verbindung **12ac**, die nur einen IC<sub>50</sub>-Wert von 5.18 µM aufweist und sich damit deutlich von den anderen Verbindung in der Reihe h unterscheidet. Im Vergleich der Reihen a, b und c ist zu erkennen, dass die Aktivitäten der Verbindungen, die einen *p*-Methoxy- oder einen *p*-Fluorsubstituenten tragen, meist auf einem höheren Niveau liegen als die der unsubstituierten Analoga. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass das Vorhandensein eines Substituenten an R<sup>1</sup> vorteilhaft ist. Der im Kapitel 2 postulierte Bindemodus zeigt, dass dieses Strukturelement in Richtung Lösemittel ausgerichtet ist und Veränderungen an R<sup>1</sup> den Bindemodus zur *hinge*-Region und die Positionierung in der Bindetasche kaum beeinflussen und daher auch Aktivitäten in einer ähnlichen Größenordnung zu erwarten sind. Verbindung **12n** stellt mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 457 nM das bislang aktivste Derivat dieser Substanzklasse dar.

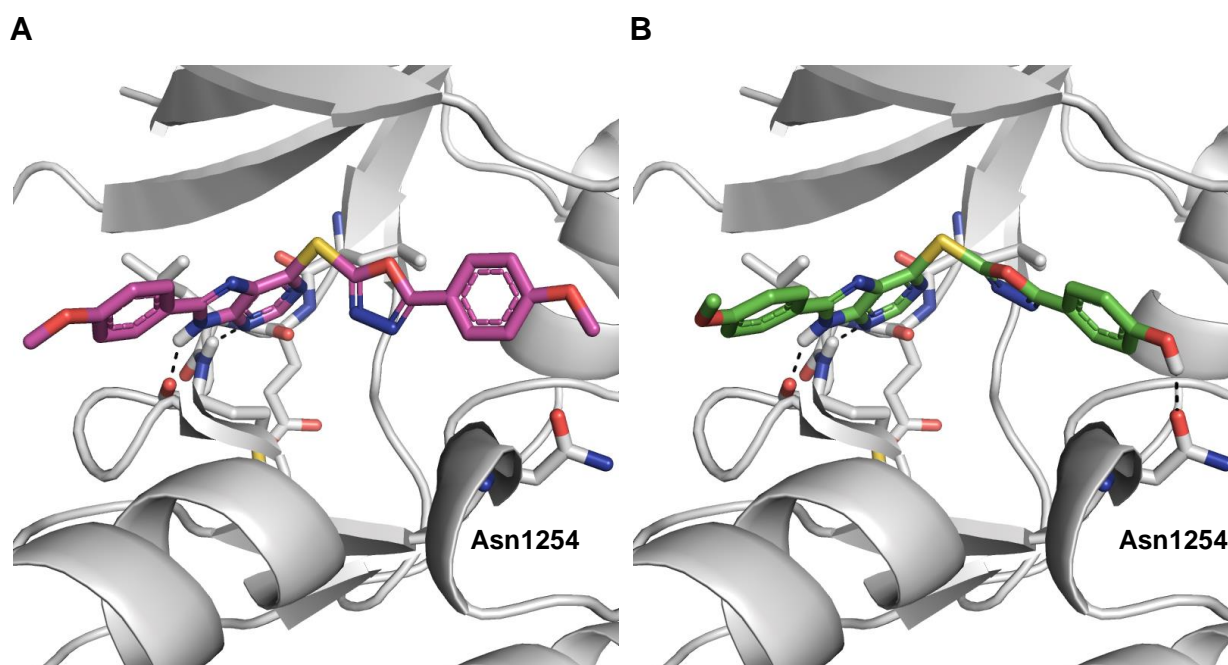
Tabelle 4-1: IC<sub>50</sub>-Werte [μM] ausgewählter Testverbindungen an ALK wt

R <sup>2</sup> \ R <sup>1</sup>	H	OCH <sub>3</sub>	F	
	4.29 <b>12t</b>	4.91 <b>12e</b>	4.98 <b>12l</b>	<i>Reihe d</i>
	0.857 <b>12u</b>	1.90 <b>12f</b>	1.95 <b>12j</b>	<i>Reihe e</i>
	8.81 <b>12v</b>	4.80 <b>12g</b>	6.34 <b>12ab</b>	<i>Reihe f</i>
	5.95 <b>12c</b>	0.961 <b>12a</b>	0.816 <b>12b</b>	<i>Reihe g</i>
	1.60 <b>12x</b>	0.457 <b>12n</b>	5.18 <b>12ac</b>	<i>Reihe h</i>
	<i>Reihe a</i>	<i>Reihe b</i>	<i>Reihe c</i>	

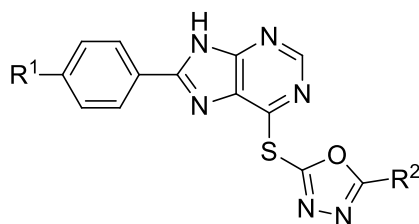
Beim Vergleich der Verbindungen **12e** und **12q** fällt auf, dass durch die Entfernung des Methylrestes hin zur freien Hydroxygruppe die Aktivität deutlich gesteigert wird (Tabelle 4-2). Beim Vergleich der *docking*-Posen dieser beiden Verbindungen ist ersichtlich, dass bei ähnlicher Orientierung neben den Interaktionen zur *hinge*-Region durch Verbindung **12q** eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zur Carbonylfunktion des Asn1254 ausgebildet werden kann (Abbildung 4-1). Da bei **12e** eine Methoxygruppe vorhanden ist, kann diese Interaktion nicht realisiert werden, was möglicherweise die schwächere Inhibition zur Folge hat.

Tabelle 4-2: IC<sub>50</sub>-Werte [μM] der Verbindungen **12e** und **12q** an ALK *wt*

Nr.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	ALK <i>wt</i>
<b>12e</b>	OCH <sub>3</sub>	4-OCH <sub>3</sub> -Phenyl	4.81
<b>12q</b>	OCH <sub>3</sub>	4-OH-Phenyl	2.99

Abbildung 4-1: Docking-Posen der Verbindungen **12e** (pink, Bild A) und **12q** (grün, Bild B) in der Bindetasche der ALK *wt* (PDB: 4MKC)

Die Einführung eines Benzylrestes an R<sup>2</sup> beeinflusst die Aktivität an ALK *wt* negativ. Sowohl für Derivat **12y**, als auch für **12o** liegen die IC<sub>50</sub>-Werte über 50 μM, was eine nur sehr schwache Inhibition der ALK bedeutet (Tabelle 4-3). Wird der *o*- oder *p*-substituierte Phenylring (Tabelle 4-1) durch einen Heterozyklus, wie einen Furylrest, ersetzt, nimmt die Inhibition der ALK ebenfalls ab (Verbindung **12aa**).

Tabelle 4-3: IC<sub>50</sub>-Werte [μM] der Verbindungen **12o**, **12y** und **12aa** an ALK wt

Nr.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	ALK wt
<b>12o</b>	OCH <sub>3</sub>	Benzyl	51.7
<b>12y</b>	H	Benzyl	75.5
<b>12aa</b>	H	Furyl	22.5

Die Verbindungen **12p**, **12z** und **12ad**, bei denen an R<sup>2</sup> ein 4-Pyridylrest eingeführt wurde, zeigen auffällige Aktivitätsdaten, denn hier hat die Variation des Restes R<sup>1</sup> einen deutlich stärkeren Einfluss als bei den bisher beschriebenen Verbindungen. Derivat **12ad** zeigt keine Aktivität an ALK wt, während Verbindung **12p** eine Inhibition der ALK mit einem IC<sub>50</sub>-Wert < 10 μM aufweist. Abbildung 4-2 vergleicht die Positionierungen dieser Derivate in der Bindetasche der ALK. In allen drei Fällen wurden *constraints* gesetzt, sodass zwei Wasserstoffbrücken vom Puringrundkörper zur *hinge*-Region ausgebildet werden. Während die Lage der Purinpartialstruktur in allen Fällen sehr ähnlich ist, zeigt Verbindung **12p** eine von **12z** und **12ad** abweichende Orientierung der Oxadiazolpartialstruktur und des 4-Pyridylrestes. Dennoch sind die Unterschiede gering, sodass die Aktivitätsdifferenzen so nur schwer zu erklären sind.

Tabelle 4-4: IC<sub>50</sub>-Werte [μM] der Verbindungen **12p**, **12z** und **12ad** an ALK *wt*

Nr.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	ALK <i>wt</i>
<b>12p</b>	OCH <sub>3</sub>	4-Pyridyl	9.64
<b>12z</b>	H	4-Pyridyl	26.6
<b>12ad</b>	F	4-Pyridyl	> 100

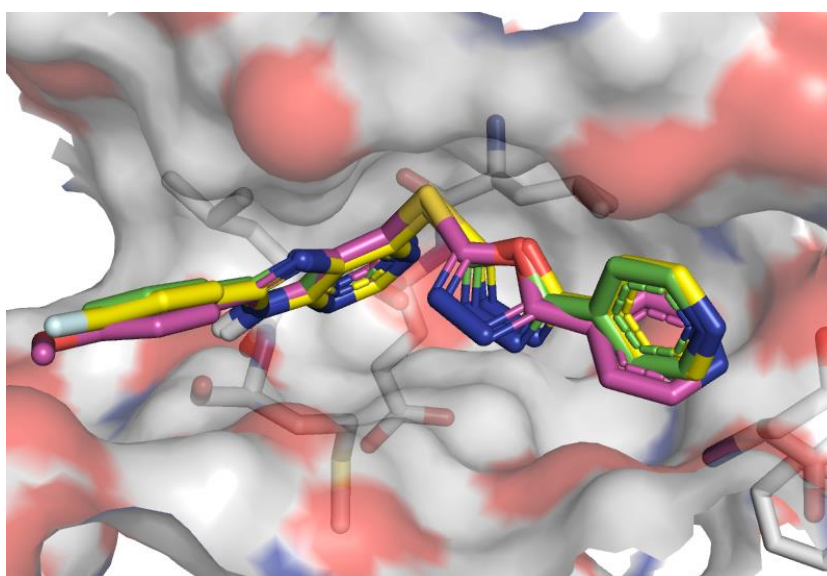
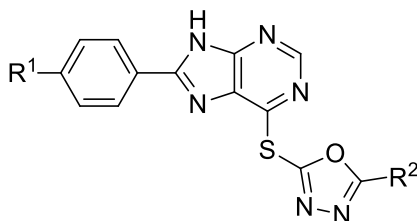
Abbildung 4-2: Docking der Verbindungen **12p** (pink), **12z** (grün) und **12ad** (gelb) in ALK *wt* (PDB: 4MKC)

Tabelle 4-5 vergleicht die Aktivitäten verschiedener Derivate an ALK *wt* und ALK L1196M. Auffällig ist dabei die Verbindung **12w**, die an ALK *wt* inaktiv ist, jedoch an ALK L1196M eine Inhibition zeigt (IC<sub>50</sub>-Wert: 7.36 μM). Bei anderen Derivaten dieser Substanzklasse wird dagegen eine Inhibition der ALK *wt* und ihrer L1196M Mutanten in der gleichen Größenordnung beobachtet (siehe unten). Verbindung **12k** hingegen, die an R<sup>1</sup> einen Fluorsubstituenten trägt, weist eine deutlich stärkere Inhibition der ALK *wt* auf als **12w**. Durch Einführung einer Methylgruppe an den Phenylring (R<sup>2</sup>) der Substanz **12w** wird die Aktivität gesteigert (Verbindung **12s**). Die verwandte

Verbindung **12d**, die an R<sup>1</sup> einen Methoxysubstituenten trägt, inhibiert die ALK stärker. Dieser Effekt der Methoxy-Substitution wurde in ähnlicher Weise auch in anderen Serien beobachtet. Das entsprechende *ortho*-Methyl-Analogon **12m** zeigt ebenfalls eine Inhibition der ALK *wt* im gleichen Konzentrationsbereich.

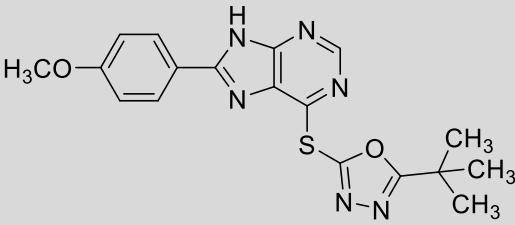
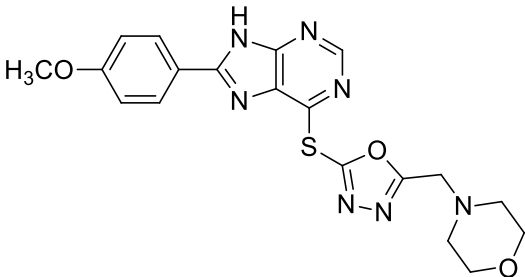
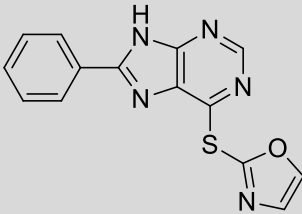
Tabelle 4-5: IC<sub>50</sub>-Werte [μM] verschiedener Verbindungen an ALK *wt* und ALK L1196M



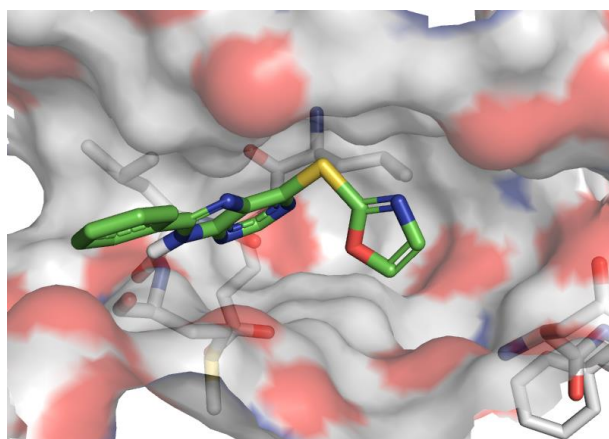
Nr.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	ALK <i>wt</i>	ALK L1196M
<b>12w</b>	H	Phenyl	> 100	7.36
<b>12k</b>	F	Phenyl	6.01	4.68
<b>12s</b>	H	4-CH <sub>3</sub> -Phenyl	10.5	7.16
<b>12d</b>	OCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> -Phenyl	2.08	1.95
<b>12m</b>	OCH <sub>3</sub>	2-CH <sub>3</sub> -Phenyl	2.06	1.81

Die Untersuchung der Verbindungen **12r** und **12i** zeigte, dass der Austausch des aromatischen Restes R<sup>2</sup> an der Oxadiazolpartialstruktur gegen einen aliphatischen zum Aktivitätsverlust oder zur deutlichen Aktivitätsabnahme führt. Zur weiteren Bewertung struktureller Modifikationen wurde Verbindung **38** synthetisiert, die auch inaktiv an ALK *wt* ist (Tabelle 4-6). Aufgrund der fehlenden Aktivitäten der Verbindungen **38**, **12i** und **12r** lässt sich postulieren, dass ein aromatischer Rest an R<sup>2</sup> essentiell für die Wirkung an der ALK *wt* ist. Die *docking*-Pose der Verbindung **38** in der Bindetasche der ALK zeigt, dass der hintere Bereich der Bindetasche nicht besetzt wird, wodurch der zur Verfügung stehende Raum im Vergleich zu Derivaten mit einem aromatischen Rest an R<sup>2</sup> nicht ausgenutzt wird, was bereits für Verbindung **12i** beobachtet werden konnte (Abbildung 4-3, Abbildung 2-15). Dies dürfte sich ungünstig auf die inhibitorische Aktivität an ALK auswirken.

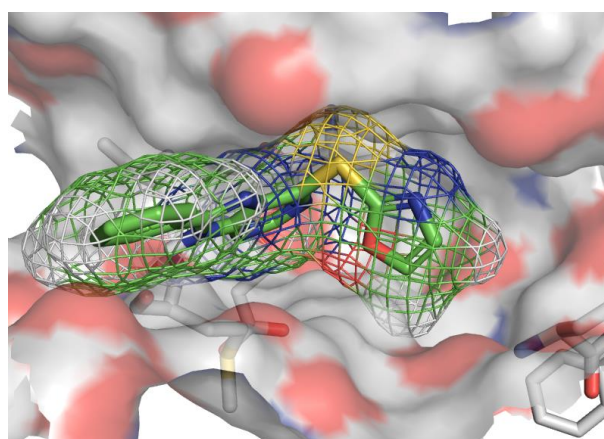
Tabelle 4-6: IC<sub>50</sub>-Werte [μM] der Verbindungen **12i**, **12r** und **38** an ALK wt

Nr.	Struktur	ALK wt
<b>12i</b>		31.4
<b>12r</b>		> 100
<b>38</b>		93.5

A

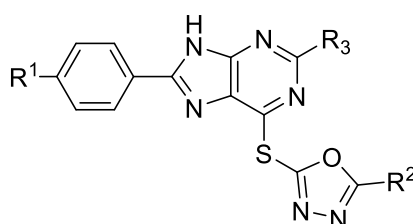


B


 Abbildung 4-3: Docking-Pose der Verbindung **38** in der Bindetasche der ALK (PDB: 4MKC)

Legt man den in dieser Arbeit für die Testverbindungen allgemein postulierten Bindemodus in der ATP-Bindetasche zu Grunde, dann sollte die Einführung einer Aminogruppe in 2-Position des Puringrundkörpers eine zusätzliche Interaktion mit der *hinge*-Region ermöglichen. Dies wurde jedoch durch die biologischen Daten nicht bestätigt, denn **13a** und **13b** erwiesen sich als deutlich schwächer aktiv als ihre Analoga ohne Aminogruppe (**12b** und **12ac**) (Tabelle 4-7).

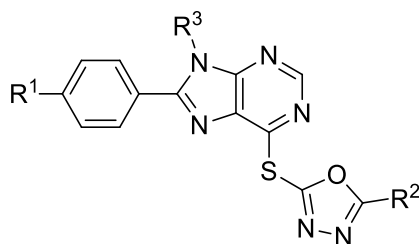
Tabelle 4-7: IC<sub>50</sub>-Werte [μM] der Verbindungen **13a,b** und **12b,ac** an ALK *wt*



Nr.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	ALK <i>wt</i>
<b>13a</b>	F	4-Cl-Phenyl	NH <sub>2</sub>	13.5
<b>13b</b>	F	2,4-di-Cl-Phenyl	NH <sub>2</sub>	13.0
<b>12b</b>	F	4-Cl-Phenyl	H	0.816
<b>12ac</b>	F	2,4-di-Cl-Phenyl	H	5.18

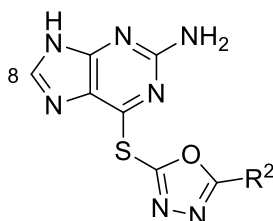
Die am N(9)-Atom alkylierte Verbindung **14** wurde synthetisiert und getestet, um die Relevanz der Wasserstoffbrücken zur *hinge*-Region zu überprüfen. Im Vergleich zu der analogen Substanz **12a** ohne Ethylseitenkette hat die Aktivität an ALK *wt* deutlich abgenommen (Tabelle 4-8). Zwar konnte bei **14** noch eine Aktivität unterhalb von 10 μM gemessen werden, diese ist jedoch um den Faktor 8.4 schlechter als bei **12a**, was die Vermutung zulässt, dass die Wasserstoffbrücke vom N(9)-H-Atom zum Met1199 der *hinge*-Region essentiell für die Inhibition der ALK ist.



Tabelle 4-8: IC<sub>50</sub>-Werte [μM] der Verbindungen **12a** und **14** an ALK wt

Nr.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	ALK wt
<b>12a</b>	OCH <sub>3</sub>	4-Cl-Phenyl	H	0.961
<b>14</b>	OCH <sub>3</sub>	4-Cl-Phenyl	Ethyl	8.12

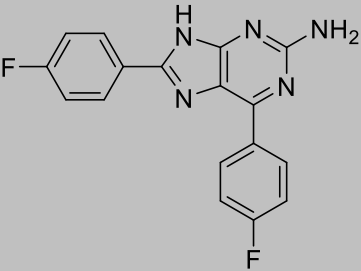
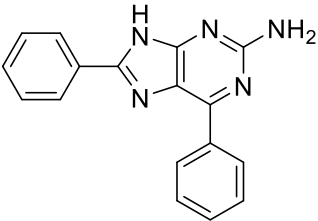
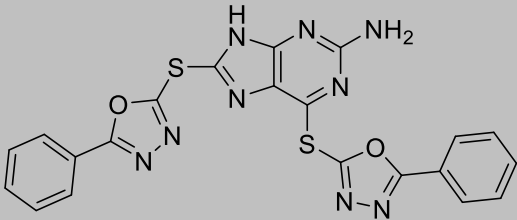
Des Weiteren wurde untersucht, welche Auswirkungen das Entfernen des aromatischen Substituenten an Position 8 der Purinpartialstruktur hat (Verbindungen **15a** – **15c**, Tabelle 4-9). Im Vergleich zu den Derivaten **13a** und **13b** (Tabelle 4-7) und zu den analogen Substanzen der Serie **12** ohne Aminogruppe (Tabelle 4-1), ist bei **15a** – **15c** die Aktivität an ALK wt deutlich reduziert, was darauf hindeutet, dass der aromatische Rest an der Purinpartialstruktur wichtig für die Wirkung an ALK wt ist.

Tabelle 4-9: IC<sub>50</sub>-Werte [μM] der Verbindungen **15a-c** an ALK wt

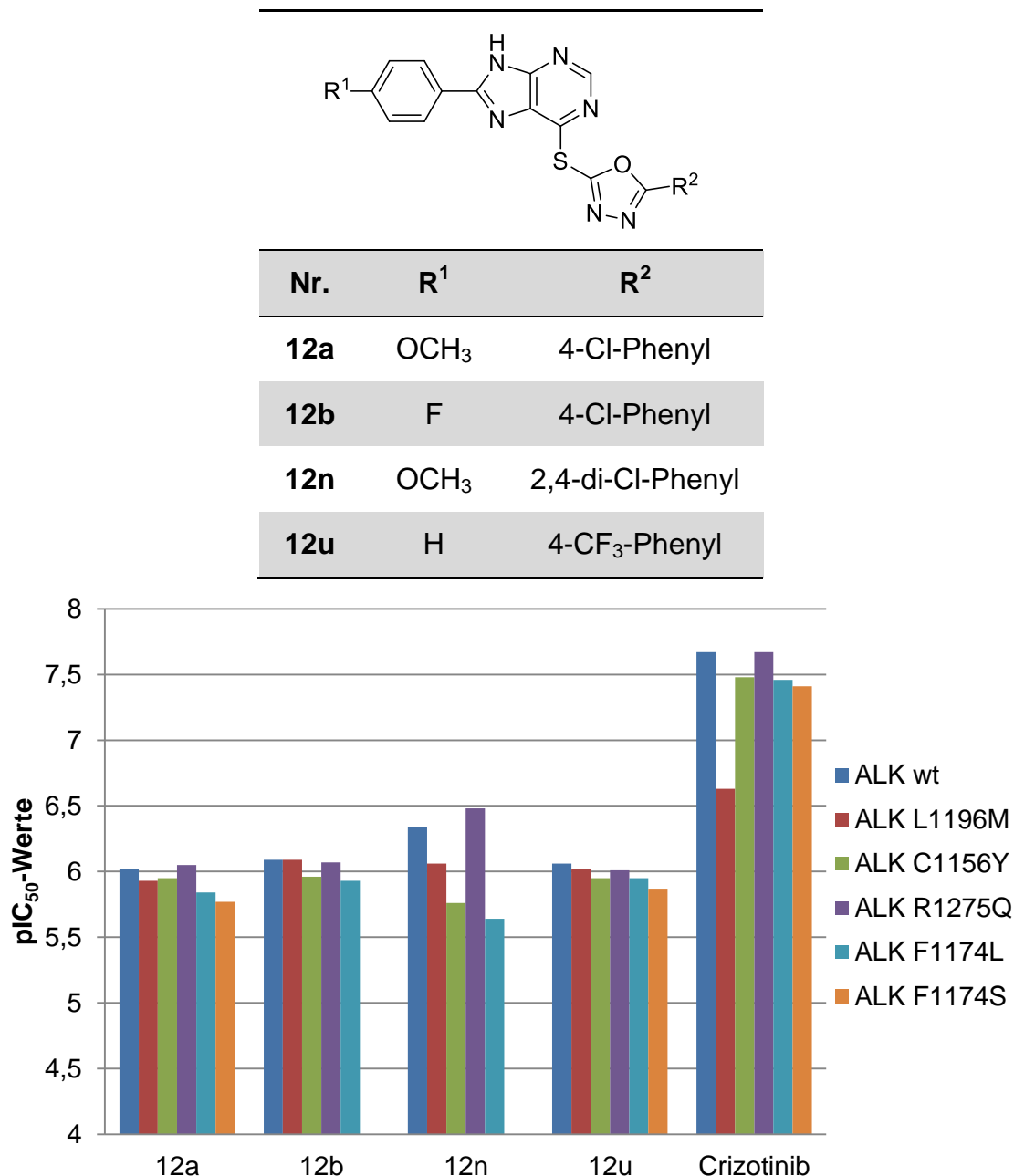
Nr.	R <sup>2</sup>	ALK wt
<b>15a</b>	4-Cl-Phenyl	21.2
<b>15b</b>	4-CF <sub>3</sub> -Phenyl	21.4
<b>15c</b>	2-Cl-Phenyl	18.6

Die Verbindungen **24a,b** und **27** sind im Rahmen der Versuche zur Synthese von 6-Chlor-8-(4-fluorphenyl)-9*H*-purin-2-amin (**23**) entstanden und wurden ebenfalls in Hinblick auf ihre Aktivität an ALK *wt* überprüft. Während Verbindung **27** die ALK nur sehr schwach inhibiert, weisen **24a** und **24b** IC<sub>50</sub>-Werte unter 10 µM auf und liegen damit in einer ähnlichen Größenordnung wie einige der Derivate mit der Grundstruktur **12** (Tabelle 4-1).

Tabelle 4-10: IC<sub>50</sub>-Werte [µM] der Verbindungen **24a,b** und **27** an ALK *wt*

Nr.	Struktur	ALK <i>wt</i>
<b>24a</b>		4.99
<b>24b</b>		6.54
<b>27</b>		23.0

Neben den Inhibitionswerten an ALK *wt* sind auch die Aktivitäten an den ALK-Mutanten äußerst wichtig. Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, kann der Austausch von Aminosäuren in der Kinaseregion zu einer Resistenzentwicklung gegen Inhibitoren führen. Besonders häufig wird die *gatekeeper*-Mutation beobachtet, bei der Leucin gegen Methionin ausgetauscht wird. Der ALK-Inhibitor Crizotinib erleidet dadurch einen deutlichen Aktivitätsverlust (ALK *wt*: IC<sub>50</sub>-Wert = 0.021 µM und ALK L1196M: IC<sub>50</sub>-Wert = 0.233 µM), was sich auch in der Therapie von NSCLC-Patienten durch eine Resistenzentwicklung gezeigt hat. Daher ist die Evaluierung des Aktivitätsprofils an den verschiedenen ALK-Mutanten von großer Bedeutung.

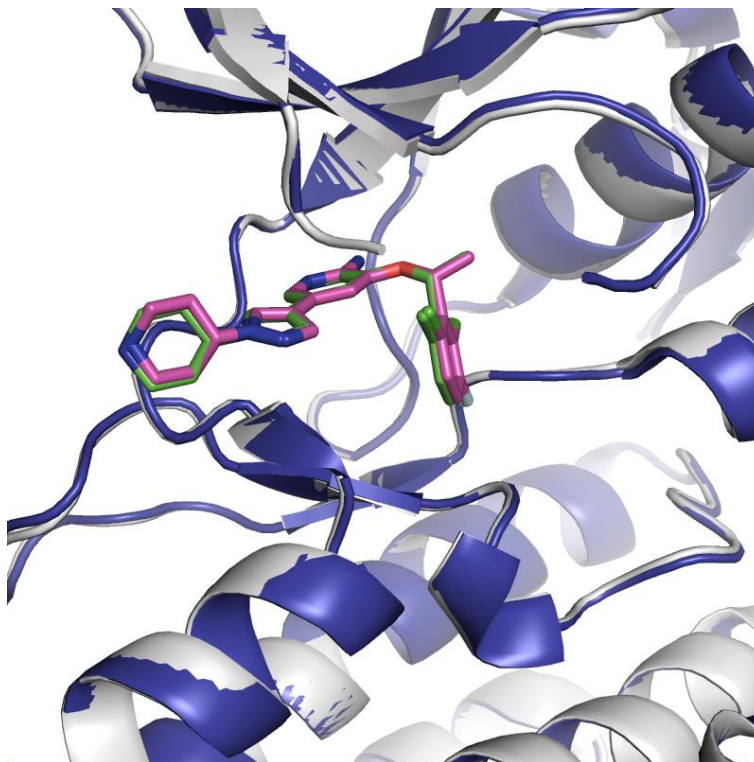


**Abbildung 4-4:** Aktivitätsprofile der Verbindungen **12a**, **12b**, **12n**, **12u** und von Crizotinib (**1**) an ALK *wt* und verschiedenen ALK-Mutanten

In Abbildung 4-4 erfolgt ein Vergleich der Aktivitätsprofile einiger an ALK aktiver Substanzen mit dem von Crizotinib. Es ist zu erkennen, dass die Aktivität des Arzneistoffes Crizotinib an allen hier gezeigten Kinasen höher ist, jedoch nimmt die Inhibition von Crizotinib an ALK L1196M deutlich ab. Der pIC<sub>50</sub>-Wert sinkt in diesem Fall um eine Größenordnung (pIC<sub>50</sub>: 7.67 → 6.63), was ein deutlicher Unterschied zu den hier neu beschriebenen Substanzen ist, die ihre Aktivität auch an der *gatekeeper*-Mutante in der gleichen Größenordnung wie an ALK *wt* aufrecht erhalten.

Das Aktivitätsprofil an den anderen Mutanten liegt auf einem ähnlichen Niveau. Ein etwas unregelmäßigeres Bild zeigt dabei Verbindung **12n**. In Bezug auf das Aktivitätsprofil an den anderen Mutanten zeigt Crizotinib ein vergleichbares Bild, da im Unterschied zu der *gatekeeper*-Mutation die Aktivität auch hier in einem ähnlichen Bereich wie an ALK *wt* erhalten bleibt.

Bereits in Kapitel 1.5 wurde der Bindemodus des Arzneistoffes Crizotinib in der Bindetasche der ALK *wt* beschrieben (PDB: 2XP2). Für die Kinase, die die *gatekeeper*-Mutation (L1196M) trägt, ist ebenfalls eine Cokristallstruktur mit Crizotinib vorhanden (PDB: 2YFX).<sup>50</sup> Abbildung 4-5 vergleicht die Lage des Inhibitors in beiden Kristallstrukturen; dabei ist ersichtlich, dass die Positionierung in den Bindetaschen sehr ähnlich ist. Bei genauerer Betrachtung der Kristallstruktur 2YFX fallen keine sterischen Konflikte oder sonstige ungünstige Wechselwirkungen auf, die den Aktivitätsverlust begründen könnten. FRIBOULET *et al.* diskutieren, dass es durch die Einführung von Methionin an Stelle von Leucin an der Position des *gatekeepers* zu einer sterischen Beeinflussung und zu ungünstigen Wechselwirkungen des Methionins mit der Aminogruppe und der Methylgruppe des Crizotinibs kommt.<sup>33</sup>



**Abbildung 4-5:** Vergleich der Bindemodi von Crizotinib: ALK L1196M (blau, 2YFX) + Crizotinib (pink); ALK *wt* (grau, 2XP2) + Crizotinib (grün)

Verbindung **12a** wurde in die Kristallstruktur 2YFX gedockt, um den Einfluss der *gatekeeper*-Mutation auf den Bindemodus zu untersuchen (Abbildung 4-6). Trotz Austausch des *gatekeepers* konnte eine sinnvolle Pose generiert werden, bei der keine ungünstigen Interaktionen beobachtet werden (Abbildung 4-6, Darstellung B). Die Positionierung in der Bindetasche ist sehr ähnlich zu der in ALK *wt* (Abbildung 4-6, Darstellung A). In beiden Fällen werden Interaktionen zu Met1199 (*gk+3*) in Form von Wasserstoffbrücken ausgebildet. Das Aufrechterhalten des Bindemodus könnte ein Erklärungsansatz für den Erhalt der Aktivität an der ALK L1196M-Mutante sein.

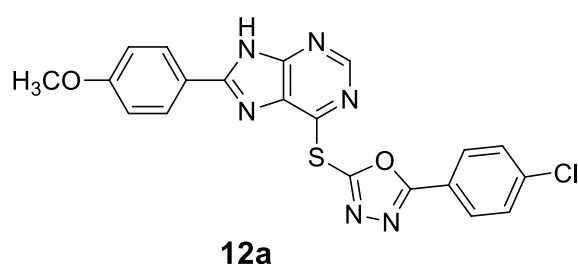
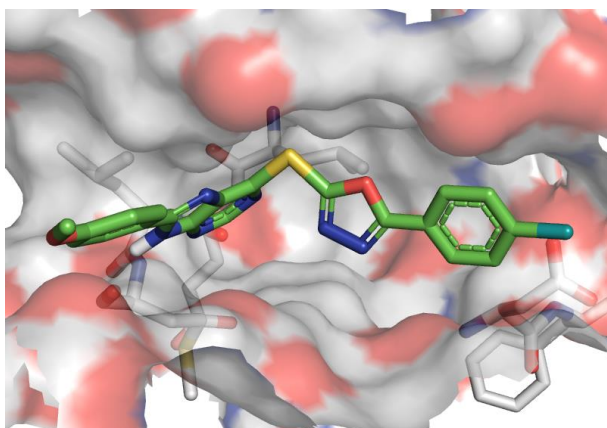
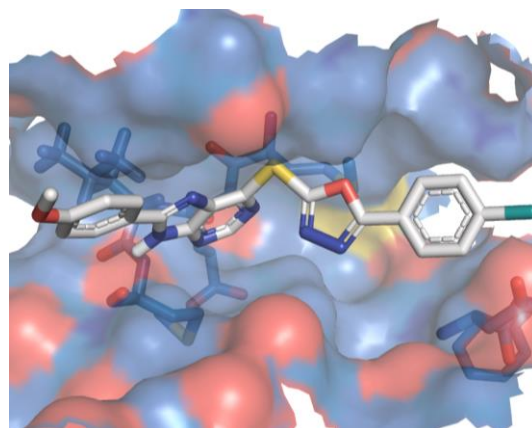
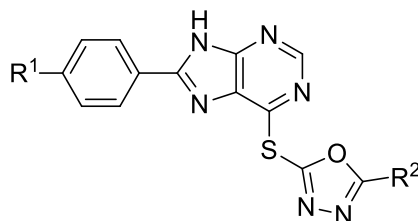
**A****B**

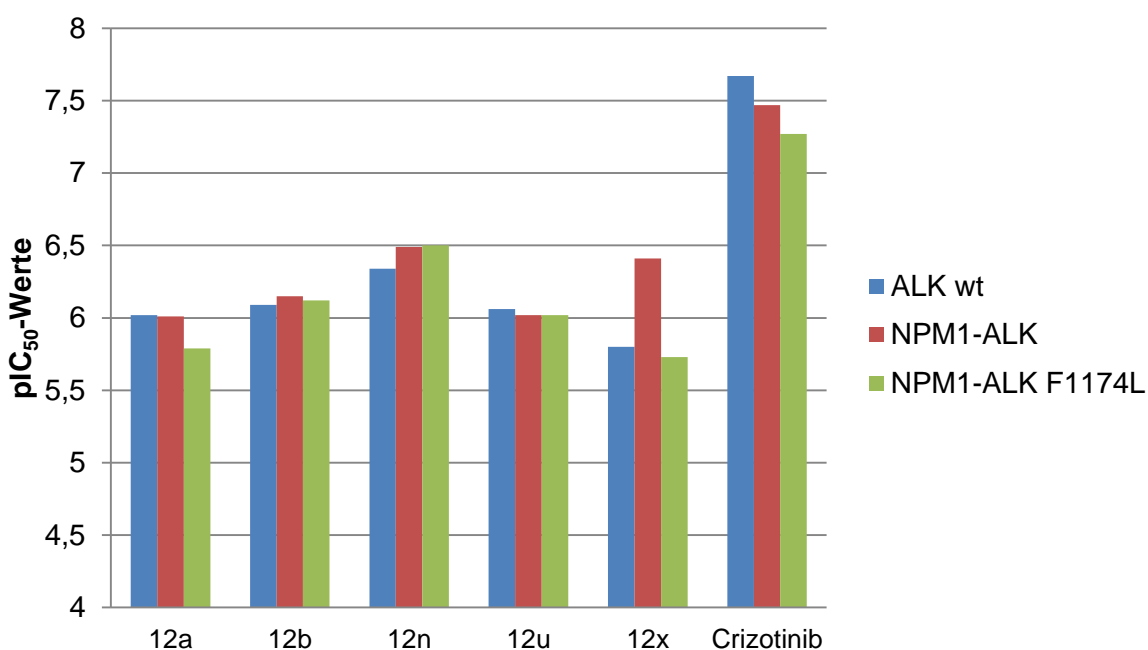
Abbildung 4-6: Docking der Verbindung **12a** in ALK *wt* (grau, 4MKC): Bild A und ALK L1196M (blau, 2FYX): Bild B

Des Weiteren erfolgte die Messung von Inhibitionswerten an der Kinase NPM1-ALK, die durch eine Fusion der Gene von NPM1 und ALK hervorgerufen wird, und NPM1-ALK F1174L, welche eine zusätzlich Mutation trägt. Auch hier liegen die Inhibitionswerte in einem ähnlichen Bereich wie an ALK *wt*, was bei Crizotinib ebenfalls vergleichbar ist. Da bei einigen ALK-assoziierten Erkrankungen dieses Fusionsgen beobachtet werden konnte, hat die Aufrechterhaltung der Aktivität an NPM1-ALK eine wichtige Bedeutung. Hervorzuheben sind hier die Verbindungen **12n**

und **12x**, die NPM1-ALK stärker inhibieren als ALK *wt* und außerdem insgesamt gesehen die niedrigsten IC<sub>50</sub>-Werte aufweisen. Beide Verbindungen tragen an der Oxadiazolpartialstruktur einen 2,4-di-Chlorphenylrest, der sich günstig auf die Aktivität an NPM1-ALK auswirkt. Dagegen ist Verbindung **12a** lediglich mit einem 4-Cl-Phenylrest substituiert, was zu einer schwächeren Inhibition führt.



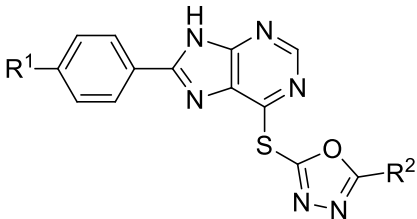
Nr.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
<b>12a</b>	OCH <sub>3</sub>	4-Cl-Phenyl
<b>12b</b>	F	4-Cl-Phenyl
<b>12n</b>	OCH <sub>3</sub>	2,4-di-Cl-Phenyl
<b>12u</b>	H	4-CF <sub>3</sub> -Phenyl
<b>12x</b>	H	2,4-di-Cl-Phenyl



**Abbildung 4-7:** Vergleich der Aktivitäten der Verbindungen **12a**, **12b**, **12n**, **12u** und **12x** und von Crizotinib (**1**) an ALK *wt*, NPM1-ALK und NPM1-ALK F1174L

Relevant sind außerdem die Aktivitätsdaten an cMet, da Crizotinib ein dualer Inhibitor von ALK (IC<sub>50</sub>-Wert: 0.021 µM) und cMet (IC<sub>50</sub>-Wert: 0.104 µM) ist. Ein Vergleich der Aktivitäten an cMet und ALK lässt damit einen Selektivitätsvergleich zu Crizotinib zu. Die Mehrheit der hier vorgestellten neuen Substanzen zeigt keine Aktivität an cMet (IC<sub>50</sub>-Wert > 100 µM). Verbindung **12b** weist als einzige an cMet einen IC<sub>50</sub>-Wert unterhalb von 10 µM auf. Insgesamt lässt sich daher feststellen, dass die Mehrzahl der Substanzen eine höhere Selektivität für ALK im Vergleich zu cMet besitzt als Crizotinib.

Tabelle 4-11: Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte [µM] von Verbindung **12b** an ALK *wt* und cMet

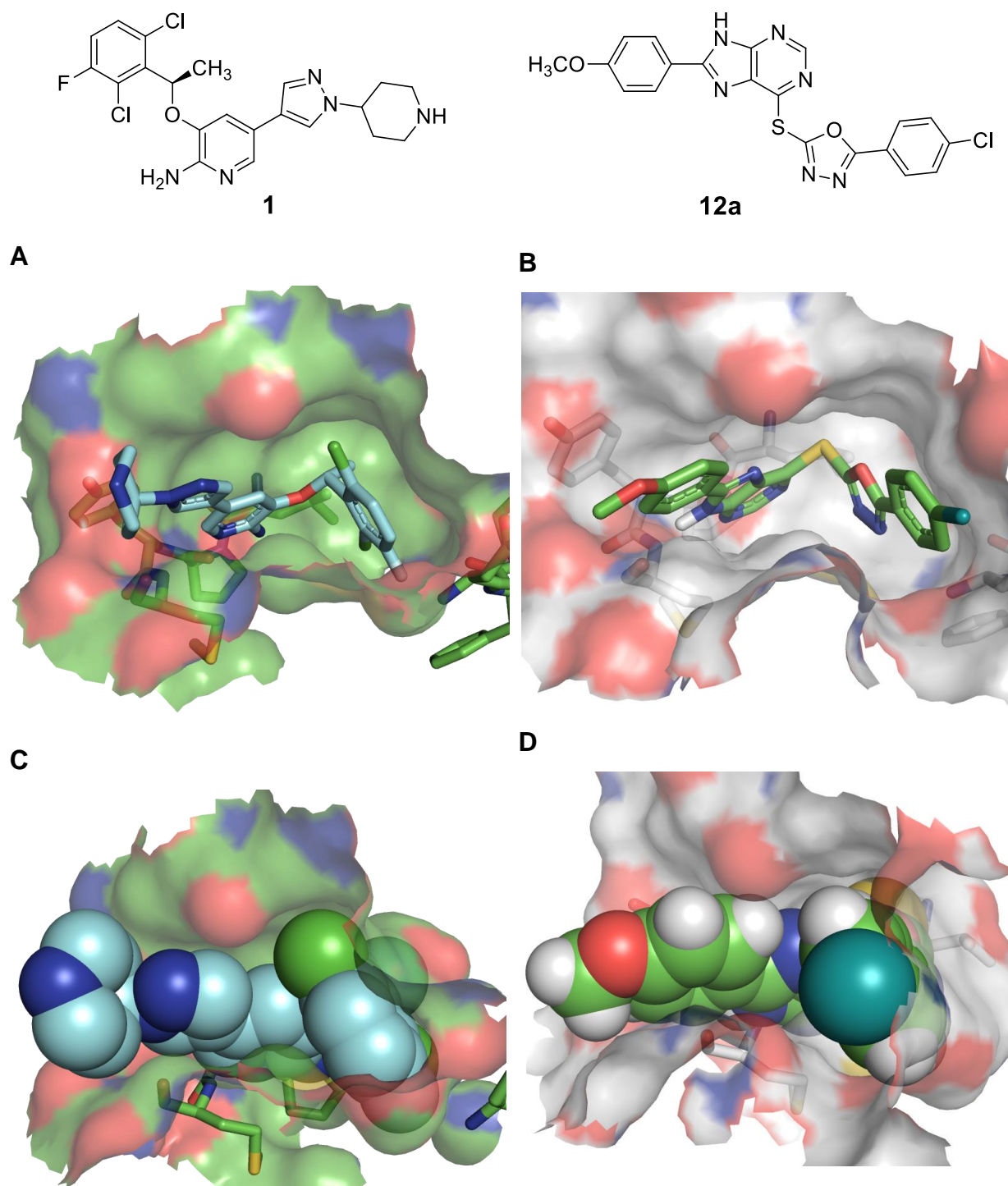


Nr.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	cMet	ALK <i>wt</i>
<b>12b</b>	F	4-Cl-Phenyl	6.89	0.816

Abbildung 4-8 zeigt eine Kristallstruktur von cMet kokristallisiert mit Crizotinib (Bild A, C). Die Lage in der Bindetasche ist vergleichbar zu der in der ALK (vgl. Abbildung 1-12). Auch hier werden zwei Interaktionen zur *hinge*-Region ausgebildet, wobei sich eine Wasserstoffbrücke zwischen der Aminofunktion von Crizotinib und Pro1158 (*gk*+1) und eine weitere zwischen dem Pyridinstickstoff und Met1160 (*gk*+3) bildet. Der halogensubstituierte Phenylring ragt in eine tiefe Tasche, ähnlich wie in der Bindetasche der ALK (siehe Abbildung 1-12). Die Ausnutzung dieser tiefen Tasche und des hinteren Bereiches der Bindetasche ist besonders gut in der Kalotten-Darstellung zu erkennen (Bild C). Um die auffällige Inaktivität der in dieser Arbeit vorgestellten Testverbindungen näher zu untersuchen, erfolgte ein retrospektives *docking* der Verbindung **12a** in die Bindetasche von cMet (Abbildung 4-8). Durch das Setzen von *constraints* wurden zwei Wasserstoffbrücken vom Puringrundkörper zum Met1160 der *hinge*-Region ausgebildet. Ein deutlicher Unterschied zu der Lage von Crizotinib in der Bindetasche ist, dass die tiefe Kavität im hinteren Bereich der Bindetasche nicht ausgefüllt wird, was vor allem die Kalotten-Darstellung (Bild D) erkennen lässt. Crizotinib füllt diesen Raum sehr gut aus, was durch Verbindung **12a**



nicht möglich ist. Diese Beobachtung könnte ein Grund für die fehlende Aktivität der Testverbindungen an cMet sein.



**Abbildung 4-8:** Vergleich der Posen von Crizotinib (**1**) und **12a** in cMet: Bild A/C: Kristallstruktur von Crizotinib in cMet (PDB: 2WGJ); Bild B/D: *docking*-Pose von **12a** in cMet (PDB: 2WGJ)

Das von WÖLFEL beschriebene HTS lieferte eine Hitstruktur, die neben ALK auch FAK und AXL inhibierte, weshalb im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls Testungen an



den genannten Kinasen durchgeführt wurden. Hier zeigen sich bei den verschiedenen Testverbindungen sehr unregelmäßige Ergebnisse (Kapitel 8.5), wobei viele der Substanzen eine nur sehr schwache Inhibition aufweisen. Exemplarisch werden hier die vier an ALK *wt* aktivsten Verbindungen dargestellt. Crizotinib zeigt an allen drei Kinasen eine Inhibition in ähnlicher Größenordnung. Bei den Verbindungen **12a** und **12b** ist diese an AXL und FAK schwächer als an ALK *wt*, sodass sie im Vergleich zu Crizotinib als selektiver bezeichnet werden können. Verbindung **12u** ist inaktiv an AXL, inhibiert FAK jedoch mit einem ähnlichen IC<sub>50</sub>-Wert wie ALK *wt*. Im Vergleich dazu weist Verbindung **12n** zwar eine Inhibition von AXL und FAK im submikromolaren bis niedrig mikromolaren Bereich auf, jedoch ist die Inhibition der ALK *wt* stärker ausgeprägt.

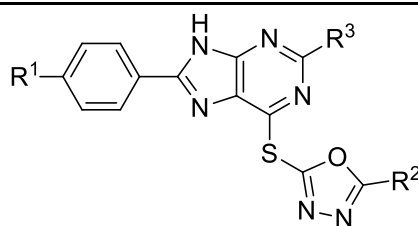
**Tabelle 4-12:** IC<sub>50</sub>-Werte [µM] ausgewählter Verbindungen an ALK *wt*, AXL, FAK

Nr.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	ALK <i>wt</i>	AXL	FAK
<b>12a</b>	OCH <sub>3</sub>	4-Cl-Phenyl	0.961	5.75	3.48
<b>12b</b>	F	4-Cl-Phenyl	0.816	28.7	1.38
<b>12n</b>	OCH <sub>3</sub>	2,4-di-Cl-Phenyl	0.457	0.605	1.83
<b>12u</b>	H	4-CF <sub>3</sub> -Phenyl	0.857	> 100	0.930
Crizotinib			0.021	0.067	0.059

Für einige der Verbindungen wurden Messungen an anderen tumorrelevanten Kinasen durchgeführt. An der Kinase SRC zeigt **12u** mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0.700 µM die stärkste Inhibition dieser Kinase innerhalb der Substanzklasse und liegt damit in einem ähnlichen Bereich wie Crizotinib (IC<sub>50</sub>-Wert = 0.776 µM).

## 5. Physikochemische Eigenschaften

In der Arzneistoffentwicklung sind neben der biologischen Aktivität auch die physikochemischen Eigenschaften relevant zur Abschätzung der *druglikeness*, da sie entscheidend für die Bioverfügbarkeit eines Medikamentes und damit auch ausschlaggebend für dessen Wirkung sind.<sup>153, 154</sup> Die von LIPINSKI *et al.* entwickelte „*rule of five*“ ermöglicht eine grobe Abschätzung der oralen Bioverfügbarkeit. Demnach sollte ein Molekül nicht mehr als fünf Wasserstoffbrückendonatoren und nicht mehr als zehn Wasserstoffbrückenakzeptoren haben. Des Weiteren sollte die Molekülmasse unter 500 g/mol liegen und der logP-Wert (P = Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient) maximal fünf betragen.<sup>155</sup> Ein Parameter, der biologische Aktivität und physikochemische Eigenschaften ins Verhältnis setzt, ist *lipophilic efficiency* (LipE), oder auch *ligand-lipophilicity efficiency* (LLE). Dieser Wert berechnet sich aus der Differenz aus pIC<sub>50</sub>-Wert und logP-Wert der Substanz und soll einen Vergleich verschiedener Verbindungen erlauben ( $\text{LipE} = \text{LLE} = \text{pIC}_{50} - \log\text{P}$ ).<sup>156, 157</sup> ARNNOTT *et al.* beschreiben, dass der optimale Bereich des logP-Wertes zwischen 1 und 3 liegt.<sup>156</sup> Nach LEESON *et al.* beträgt der durchschnittliche logP-Wert für orale Arzneistoffe 2.5 und die Aktivität liegt im Bereich zwischen 1 – 10 nM, woraus sich für den LLE-Wert ein Bereich von 5 – 7 oder größer ergibt.<sup>158</sup> Für die Testverbindungen wurden LLE-Werte aus den jeweiligen IC<sub>50</sub>-Werten und berechneten logP-Werten bestimmt (Tabelle 5-1 und Tabelle 5-2). Bei Betrachtung der logP-Werte fällt auf, dass diese für die Mehrzahl der Verbindungen deutlich über 3 liegen, was die hohe Lipophilie der Verbindungsklasse widerspiegelt. Den niedrigsten logP-Wert weist Verbindung **12r** auf, die jedoch inaktiv an ALK *wt* ist. Bei den Verbindungen mit den niedrigsten IC<sub>50</sub>-Werten an ALK *wt* (**12a**, **12b**, **12n** und **12u**) ergeben sich auf Grund der hohen Lipophilie LLE-Werte zwischen 0.99 – 1.37. Interessant ist ein Vergleich zu der aktivsten Verbindung aus der von WÖLFEL synthetisierten Strukturklasse.<sup>159</sup> Verbindung **43** (Tabelle 5-2) erreicht bei einem IC<sub>50</sub>-Wert von 650 nM einen LLE-Wert von 0.84, was niedriger als bei ähnlich aktiven Verbindungen der hier dargestellten Verbindungsklasse ist. Daher konnte durch die Abwandlung der Thienopyrimidinderivate hin zu Purinderivaten eine Verbesserung der physikochemischen Eigenschaften erreicht werden. Dennoch besteht hier weiterer Optimierungsbedarf, da sowohl die logP- als auch die LLE-Werte außerhalb des optimalen Bereichs liegen.

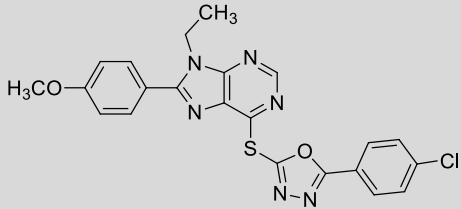
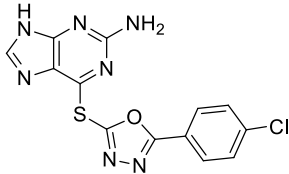
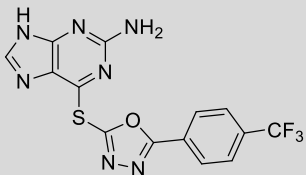
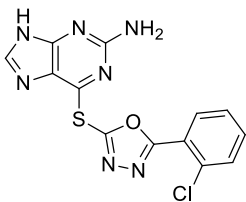
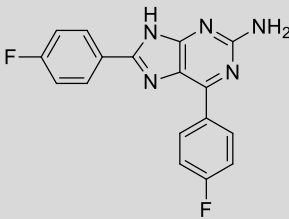
Tabelle 5-1: *Ligand-lipophilicity efficiency* (LLE) der Testverbindungen

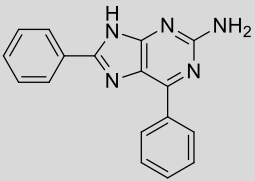
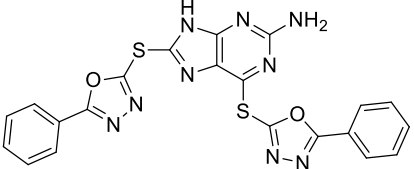
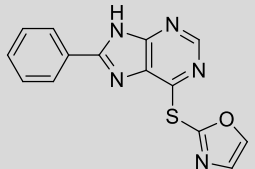
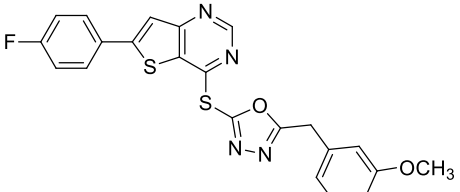
Nr.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	IC <sub>50</sub> [μM]	pIC <sub>50</sub>	logP <sup>a</sup>	LLE
12a	OCH <sub>3</sub>	4-Cl-Phenyl	H	0.961	6.02	4.65	1.37
12b	F	4-Cl-Phenyl	H	0.816	6.09	4.95	1.14
12c	H	4-Cl-Phenyl	H	5.95	5.23	4.81	0.42
12d	OCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> -Phenyl	H	2.08	5.68	4.56	1.12
12e	OCH <sub>3</sub>	4-OCH <sub>3</sub> -Phenyl	H	4.81	5.32	3.89	1.43
12f	OCH <sub>3</sub>	4-CF <sub>3</sub> -Phenyl	H	1.90	5.72	4.92	0.80
12g	OCH <sub>3</sub>	2-Cl-Phenyl	H	4.80	5.32	4.65	0.67
12i	OCH <sub>3</sub>	<i>tert</i> -Butyl	H	31.4	4.50	3.94	0.56
12j	F	4-CF <sub>3</sub> -Phenyl	H	1.95	5.71	5.22	0.49
12k	F	Phenyl	H	6.01	5.22	4.34	0.88
12l	F	4-OCH <sub>3</sub> -Phenyl	H	4.98	5.30	4.19	1.11
12m	OCH <sub>3</sub>	2-CH <sub>3</sub> -Phenyl	H	2.06	5.69	4.56	1.13
12n	OCH <sub>3</sub>	2,4-di-Cl-Phenyl	H	0.457	6.34	5.25	1.09
12o	OCH <sub>3</sub>	Benzyl	H	51.7	4.29	3.98	0.31
12p	OCH <sub>3</sub>	4-Pyridyl	H	9.64	5.02	2.83	2.19
12q	OCH <sub>3</sub>	4-OH-Phenyl	H	2.99	5.52	3.74	1.78
12r	OCH <sub>3</sub>	Morpholinomethyl	H	> 100	nb	1.82	nb
12s	H	4-CH <sub>3</sub> -Phenyl	H	10.5	4.98	4.72	0.26
12t	H	4-OCH <sub>3</sub> -Phenyl	H	4.29	5.37	4.04	1.33
12u	H	4-CF <sub>3</sub> -Phenyl	H	0.857	6.07	5.08	0.99
12v	H	2-Cl-Phenyl	H	8.81	5.06	4.81	0.25
12w	H	Phenyl	H	> 100	nb	4.20	nb
12x	H	2,4-di-Cl-Phenyl	H	1.60	5.80	5.41	0.39
12y	H	Benzyl	H	75.5	4.12	4.13	-0.01
12z	H	4-Pyridyl	H	26.6	4.58	2.98	1.60

Nr.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	IC <sub>50</sub> [μM]	pIC <sub>50</sub>	logP <sup>a</sup>	LLE
<b>12aa</b>	H	Furyl	H	22.5	4.65	3.26	1.39
<b>12ab</b>	F	2-Cl-Phenyl	H	6.34	5.20	4.95	0.25
<b>12ac</b>	F	2,4-di-Cl-Phenyl	H	5.18	5.29	5.55	-0.26
<b>12ad</b>	F	4-Pyridyl	H	> 100	nb	3.13	nb
<b>13a</b>	F	4-Cl-Phenyl	NH <sub>2</sub>	13.5	4.87	4.80	0.07
<b>13b</b>	F	2,4-di-Cl-Phenyl	NH <sub>2</sub>	13.0	4.89	5.40	-0.51

<sup>a</sup> Die logP-Werte wurden mit chemicalize.org by ChemAxon berechnet.<sup>160</sup>

Tabelle 5-2: Ligand-lipophilicity efficiency (LLE) weiterer Testverbindungen

Nr.	Struktur	IC <sub>50</sub> [μM]	pIC <sub>50</sub>	logP <sup>a</sup>	LLE
<b>14</b>		8.12	5.09	5.23	-0.14
<b>15a</b>		21.1	4.67	2.63	2.04
<b>15b</b>		21.4	4.67	2.90	1.77
<b>15c</b>		18.6	4.73	2.63	2.10
<b>24a</b>		4.99	5.30	3.90	1.40

Nr.	Struktur	IC <sub>50</sub> [μM]	pIC <sub>50</sub>	logP <sup>a</sup>	LLE
24b		6.54	5.18	3.61	1.57
27		23.0	4.64	4.59	0.05
38		93.5	4.03	3.14	0.89
43		0.650	6.19	5.35	0.84

<sup>a</sup> Die logP-Werte wurden mit chemicalize.org by ChemAxon berechnet.<sup>160</sup>

Einen wichtigen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen hat außerdem die Löslichkeit eines Moleküls in wässrigen Systemen, da bei einer schlechten Löslichkeit die Absorption des Arzneistoffes oft ebenfalls gering ist. Die Abschätzung und Optimierung von physikochemischen Eigenschaften sollte daher schon in der frühen Entwicklungsphase eines Wirkstoffkandidaten miteinbezogen werden, sodass der Schwerpunkt nicht alleine auf der Optimierung der Aktivitätsparameter liegt.<sup>154, 161</sup>

Wie in Kapitel 1.6 erläutert, sollte in die Grundstruktur **12** eine Aminogruppe eingeführt werden (Grundstruktur **13**), um die Polarität zu steigern und die Löslichkeit zu verbessern. Um den Effekt dieser Aminogruppe genauer zu beurteilen, wurden mit den Verbindungen **12b**, **12ac**, **13a** und **13b** Löslichkeitsuntersuchungen vorgenommen (Tabelle 5-3). Nach einer von WÖLFEL aufgestellten Methode wurde die thermodynamische Löslichkeit ( $S_{0, \text{exp.}}$ ) mit einer HPLC-basierten *shake-flask*-Methode bestimmt. Dazu wird auf einen Überschuss an Feststoff eine Pufferlösung gegeben und nach Einstellung des Gleichgewichtes zwischen Feststoff und Lösung die Löslichkeit der thermodynamisch stabilsten Form bestimmt.<sup>161, 162</sup>

Im vorliegenden Fall wurden die Proben mit einer Pufferlösung (pH 7.4) versetzt und bei 25 °C für 24 h bzw. 48 h inkubiert, anschließend mittels HPLC vermessen und die

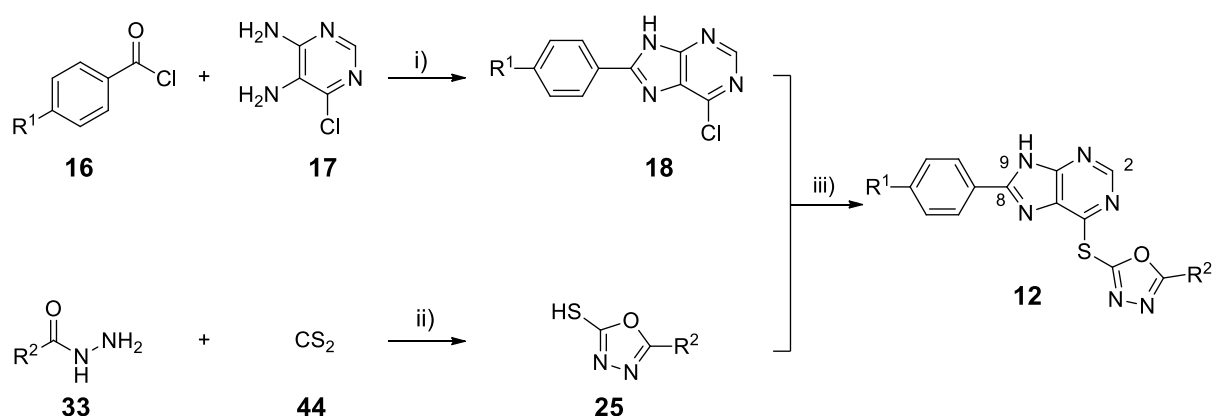
Flächen der Substanzsignale integriert (AUC). Um die Löslichkeit berechnen zu können, wurden Kalibriergeraden vermessen; dabei wurden verschiedene Verdünnungen im Lösungsmittel ACN erstellt (200 µmol/L, 20 µmol/L und 4 µmol/L) und die erhaltene AUC gegen die Konzentration aufgetragen. Eine detaillierte Beschreibung der durchgeführten Methode findet sich in Kapitel 8.4. Bei der Vermessung der Probelösungen, die nach Inkubation der Festsubstanz mit der wässrigen Pufferlösung erhalten worden waren, konnte kein Signal detektiert werden. Daher kann nur die Feststellung getroffen werden, dass die Löslichkeit aller untersuchten Verbindungen unterhalb von 4 µmol/L liegt, da dies die niedrigste gemessene Konzentration der erstellten Kalibriergerade war (Tabelle 5-3). Somit konnte durch das Einführen der Aminogruppe keine quantifizierbare Verbesserung der Löslichkeit erreicht werden.

**Tabelle 5-3:** thermodynamische Löslichkeit ( $S_{0,exp.}$ ) der Verbindungen **12b**, **12ac**, **13a** und **13b**

Nr.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	S <sub>0, exp</sub> [µmol/L]
<b>12b</b>	F	4-Cl-Phenyl	H	< 4
<b>12ac</b>	F	2,4-di-Cl-Phenyl	H	< 4
<b>13a</b>	F	4-Cl-Phenyl	NH <sub>2</sub>	< 4
<b>13b</b>	F	2,4-di-Cl-Phenyl	NH <sub>2</sub>	< 4

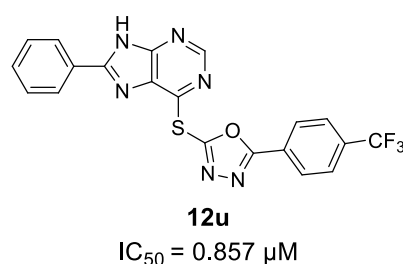
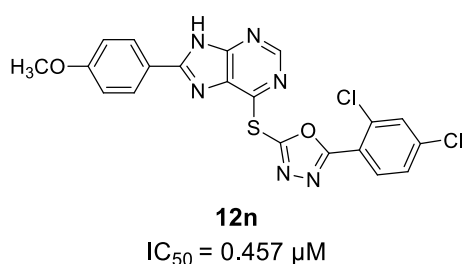
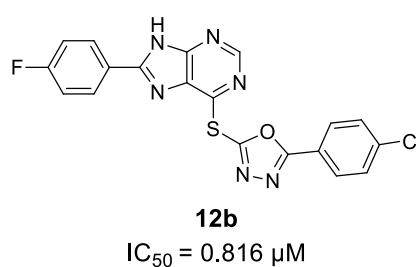
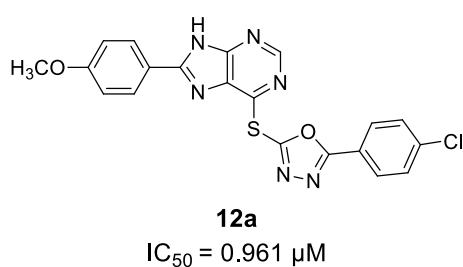
## 6. Zusammenfassung

Die *anaplastic lymphoma kinase* (ALK) ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die in Zusammenhang mit verschiedenen Krebserkrankungen, wie dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) oder dem anaplastischen großzelligen Lymphom (ALCL), gebracht wird. Problematisch in der NSCLC-Therapie mit zugelassenen ALK-Inhibitoren, wie Crizotinib, ist, dass nach einigen Behandlungsmonaten Resistenzen auftreten, weshalb die weitere Suche nach neuen potenten ALK-Inhibitoren von großem Interesse ist. Nachdem WÖLFEL auf Grundlage eines *high-throughput-screenings* Thienopyrimidinderivate als ALK-Inhibitoren entwickeln konnte, sollten diese im Rahmen dieser Arbeit zu Purinderivaten mit der Grundstruktur **12** abgewandelt werden. Durch *docking*-Untersuchungen der Testverbindungen in Kristallstrukturen der ALK konnten Hypothesen zu einem möglichen Bindemodus aufgestellt werden, bei dem von der Purinpartialstruktur zwei Interaktionen zum Met1199 (*gk+3*) der *hinge*-Region in Form von Wasserstoffbrücken ausgebildet werden. Für die Synthese von **12** wurden zunächst Purinderivate **18** aus Säurechloriden **16** und 6-Chlorpyrimidin-4,5-diamin (**17**) gewonnen. Die Darstellung der 1,3,4-Oxadiazol-2-thiole **25** erfolgte durch Zyklisierung von Hydraziden **33** unter Zusatz von Schwefelkohlenstoff (**44**). Die Edukte **18** und **25** konnten in einer anschließenden nucleophilen Substitution zu den Testverbindungen **12** kombiniert werden.



**Schema 6-1:** Synthese der Testverbindungen **12**: i) POCl<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, 100 °C, 15-24h; ii) EtOH, KOH, 6-8 h, Reflux; iii) Synthese unter konventionellen Bedingungen oder Mikrowellen-gestützt in einem geeignetem Lösungsmittel unter Zusatz einer Base

Nach entsprechender Synthese und Charakterisierung wurden die Verbindungen in Hinblick auf ihre Aktivität an ALK untersucht. Vier der synthetisierten Testverbindungen weisen dabei  $IC_{50}$ -Werte unterhalb von  $1\ \mu M$  auf, wobei Verbindung **12n** die stärkste Inhibition der ALK zeigt. Durch den Vergleich verschiedener Derivate konnte gezeigt werden, dass sich ein aromatischer Rest ( $R^2$ ) an der Oxadiazolpartialstruktur vorteilhaft auf die Aktivität der Testverbindungen auswirkt, während das Fehlen des aromatischen Restes an Position 8 der Purinpartialstruktur einen negativen Einfluss hat. Die Einführung einer Aminogruppe an Position zwei der Purinpartialstruktur führte weder zu einer Steigerung der Aktivität an ALK noch konnte die Verbesserung der physikochemischen Eigenschaften durch Löslichkeitsuntersuchungen bestätigt werden. Durch eine Ethylsubstitution am N(9)-Atom der Purinstruktur wurde die Hemmaktivität an ALK vermindert, was darauf schließen lässt, dass die Wasserstoffbrücke zwischen dem N(9)-H-Atom und Met1199 essentiell für die inhibitorische Wirkung ist.

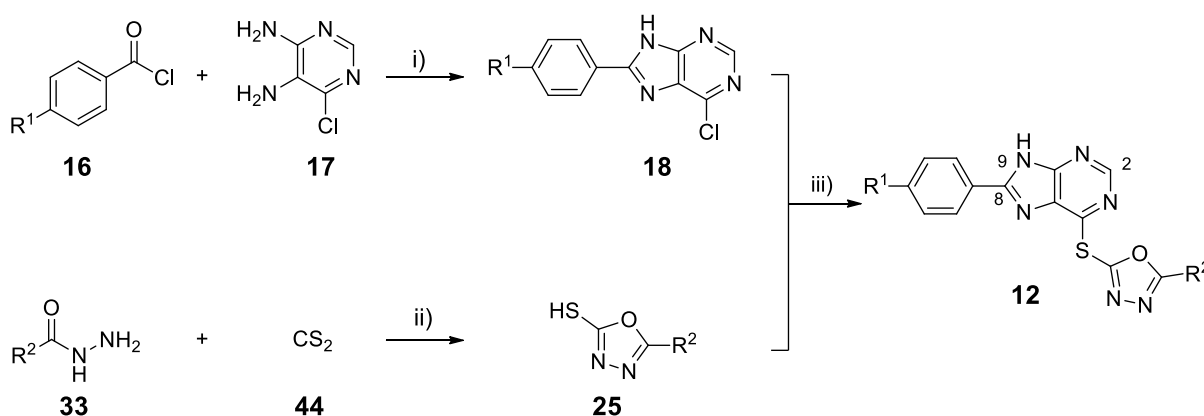


Besonders hervorzuheben ist, dass die Testverbindungen ihre Aktivität an der *gatekeeper*-Mutante ALK L1196M in einem ähnlichen Bereich wie an ALK *wt* aufrecht erhalten. Dies ist ein wichtiger Unterschied zu dem Arzneistoff Crizotinib, der an ALK L1196M deutlich an Aktivität verliert, was sich auch durch Resistenzentwicklung bei der Behandlung von NSCLC-Patienten gezeigt hat. Während Crizotinib ein dualer Inhibitor von ALK und cMet ist, zeigt die Mehrzahl der Testverbindungen aus dieser Arbeit keine Aktivität an cMet, sodass diese hier eine höhere Selektivität erreichen.



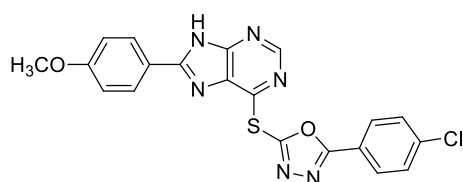
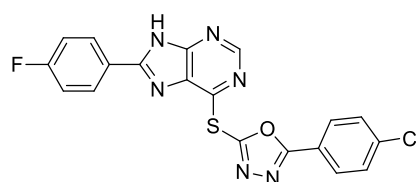
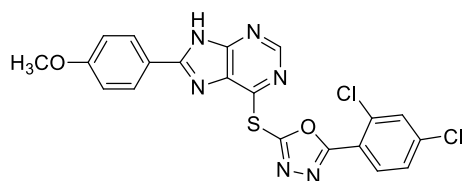
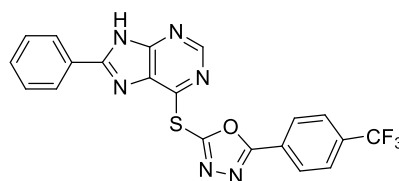
## 7. Summary

The anaplastic lymphoma kinase is a receptor tyrosine kinase associated with different types of cancer, such as non-small cell lung cancer (NSCLC) or anaplastic large cell lymphoma (ALCL). Emerging resistances are observed during the treatment of NSCLC-patients with ALK-inhibitors like Crizotinib. Therefore the further development of new potent ALK-inhibitors is of great interest. Based on a high-throughput-screening, WÖLFEL identified thienopyrimidine derivatives as ALK-inhibitors which in context of this thesis were modified to purine derivatives **12**. By performing docking studies, a possible binding mode of the compounds in the binding pocket of ALK was found in which two hydrogen bonds are formed between the purine-scaffold and Met1199 (gk+3) of the hinge region. The synthesis can be divided into three parts. The purine-derivatives **18** were synthesized by ring closure reaction of 6-chloropyrimidine-4,5-diamine **17** with various carboxylic acid chlorides **16**. The 1,3,4-oxadiazole-2-thioles **25** were prepared by condensing acid hydrazides **33** with carbon disulfide **44**. Both reactants **18** and **25** were combined in a nucleophilic substitution to give compound **12**.



**Scheme 7-1:** synthesis of compounds **12**: i)  $\text{POCl}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $100\text{ }^\circ\text{C}$ , 15-24 h; ii) EtOH, KOH, 6-8 h, reflux; iii) conventional synthesis or microwave-assisted synthesis in suitable solvent with addition of base

After synthesis and characterization, the compounds were tested with regard to their activity towards ALK. While four of the compounds **12** showed  $IC_{50}$  values below 1  $\mu M$ , compound **12n** exhibited the highest potency against ALK. Comparing different compounds, it could be determined that an aromatic moiety ( $R^2$ ) has a positive effect regarding the ALK-inhibition, while the lack of an aromatic substituent at 8-position of the purine-scaffold leads to a reduction of activity. The introduction of an amino-group at 2-position of the purine-scaffold neither raised the potency against ALK nor the solubility in aqueous solvents. The ethyl-substitution of N(9)-atom of the purine reduced the potency towards ALK, suggesting the essentiality of the hydrogen bond between the N(9)-H-atom of the purine and Met1199 for the inhibitory effect against ALK.

**12a** $IC_{50} = 0.961 \mu M$ **12b** $IC_{50} = 0.816 \mu M$ **12n** $IC_{50} = 0.457 \mu M$ **12u** $IC_{50} = 0.857 \mu M$ 

It should be particularly emphasized that the compounds maintain their activity against the gatekeeper-mutant ALK L1196M in a similar range in comparison to ALK wt. In contrast, the drug crizotinib is losing activity when tested against ALK L1196M. This problem could also be observed during the treatment of NSCLC-patients because of resistance development. While crizotinib is a dual inhibitor of ALK and cMet, the majority of the compounds of this thesis do not inhibit cMet, achieving higher selectivity in this context.

## 8. Experimenteller Teil

### 8.1 *Molecular docking*

Die pdb-Dateien der benötigten Kristallstrukturen wurden aus der *Protein Data Bank*<sup>92</sup> importiert, lokal gespeichert und mithilfe von MOE (Version 2013.08)<sup>163</sup> vorbereitet. Dazu wurde das jeweilige Protein protoniert, einer Energieminimierung unterzogen und anschließend als mol2-Datei gespeichert. Die Liganden wurden ebenfalls mit MOE vorbereitet und dabei energieminiert und als mol2-Datei gespeichert. Als *docking*-Programm wurde GOLD (GOLD Suite v 5.2.2)<sup>88</sup> auf einem Windows-basierten Rechner genutzt, wobei Hermes (v1.6.2) als Nutzeroberfläche diente. Innerhalb des Programmes wurde die Assistenzfunktion (*wizard*) angewendet, wobei sich der Vorteil bietet, dass die nötigen Vorbereitungsschritte der Reihe nach abgefragt werden. Zuerst wurde das in MOE vorbereitete Protein geladen, noch fehlende Wasserstoffatome ergänzt, das Wasser aus der Bindetasche entfernt und die vorhandenen Liganden extrahiert und als mol2-Dateien gespeichert. Des Weiteren ist es notwendig einen Bereich in der Bindetasche zu definieren, in dem das Docken erfolgen soll. Im vorliegenden Fall wurde dazu der Raum um den ursprünglich kokristallisierten Liganden im Abstand von 10 Å ausgewählt. Als Fitnessfunktion zur Bewertung der Posen wurde das *chemscore\_kinase template* geladen. Im nächsten Schritt wurde der Ligand hinzugefügt. Die Option *allow early termination* wurde deaktiviert und dafür *generate diverse solutions* aktiviert, um verschiedene Posen zu erhalten und um zu verhindern, dass das *Docking* nach Erhalt einer festgelegten Anzahl von ähnlichen Posen beendet wird. Die Sucheeffizienz wurde auf 200% gesetzt und die Anzahl der GA-runs auf 10 gesetzt, um zehn Posen pro Molekül zu erhalten. Die Funktion *save lone pairs* wurde deaktiviert, um bei einer späteren Visualisierung beispielsweise aromatische Ringe korrekt darstellen zu können. In den meisten Fällen wurden *constraints* in Form von Wasserstoffbrücken gesetzt. Die so erhaltenen Posen wurden exportiert und als sdf-Datei gespeichert. Die anschließende Visualisierung erfolgte mit PyMOL<sup>94</sup>.

## 8.2 Geräte und Methoden

### Dünnschichtchromatographie

DC-Fertigfolien Polygram® Sil G/UV<sub>254</sub>, 40 x 80 mm, 0.2 mm Kieselgel mit Fluoreszenzindikator, Fa. Macherey-Nagel, Düren; Detektion bei 254 und 366 nm; als Fließmittel wurden vorwiegend Gemische aus Ethylacetat und Petrolether verwendet.

### Elementaranalytik (CHN)

CE Instruments Flash EA® 1112 Elemental Analyzer, Fa. Thermo Quest, San Jose, CA, USA; Die berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Werte werden in Prozent angegeben.

### Hochleistungs-Flüssigchromatographie, analytisch

Gerät für die isokratische Elution: LaChrom Elite®: Pump L-2130, Autosampler L-2200, Column Oven L-2300 (eingestellt auf 40 °C), Diode-Array-Detector L-2450, Organizer Box L-2000, Trennsäule: Merck LiChroCART® 125-4, LiChrospher® 100 RP-18, 5 µM, Fa. Merck/Hitachi, Darmstadt.

Gerät für die Gradientenelution: LaChrom Elite®: Pump L-2130, Autosampler L-2200, UV-Detektor L-2400, Organizer Box L-2000, Trennsäule: Merck LiChroCART® 125-4, LiChrospher® 100 RP-18, 5 µM, Fa. Merck/Hitachi, Darmstadt.

Probenvorbereitung: Etwa 0.5 mg der Probensubstanz werden in 400 µL DMSO gelöst und durch ein Mini-UniPrep™-Filter (Whatman) filtriert. Falls erforderlich erfolgt eine Verdünnung mit DMSO, sodass das Absorptionsmaximum des Hauptpeaks zwischen 300 – 1500 mAU liegt.

Elution: Injektionsvolumen: 2 – 15 µL, Flussrate 1.000 mL/min; Gesamtlaufzeit bei isokratischer Elution: 15 min; angestrebte Gesamtretentionszeit bei isokratischer Elution  $t_r = 3 - 8$  min;  $t_m$  = Totzeit; Verlauf bei Gradientenelution: *Methode A:* ACN/H<sub>2</sub>O: 0 – 2 min: ACN 10%; 2 – 12 min: ACN 10% → 90%; 12 – 20 min: ACN 90%; *Methode B:* ACN/H<sub>2</sub>O: 0 min: ACN 10%; 0 – 13 min: ACN 10% → 90%; 13 – 20

min: ACN 90%; *Methode C*: ACN/H<sub>2</sub>O: 0 – 5 min: ACN 10%; 5 – 15 min: ACN 10% → 90%; 15 – 25 min: ACN 90%.

Elutionsmittel bei isokratischer Elution: Gemische aus ACN und H<sub>2</sub>O (bidest.) im jeweils angegebenen Verhältnis. In einigen Fällen wurde anstelle von H<sub>2</sub>O ein Puffer verwendet. (Pufferherstellung: Lösung von 20 mL Triethylamin und 242 mg Natriumhydroxid in bidestilliertem H<sub>2</sub>O *ad* 1.0 L und pH-Wert-Einstellung mit konzentrierter Schwefelsäure auf pH 2.6).

Elutionsmittel bei Gradientenelution: Gemische aus ACN und H<sub>2</sub>O (bidest.)

Detektion: sofern nicht anders angegeben: bei isokratischer Elution: DAD bei 254 nm und 280 nm; bei Gradientenelution UV bei 254 nm.

Auswertung: Integration der Peakflächen und Auswertung nach 100%-Methode; Integrationsausschluss 0 – 1.55 min, Threshold 1000; Bestimmung der Gesamtretentionszeit ( $t_r$ ) und der Totzeit ( $t_m$ ) bezogen auf DMSO, Absorptionsmaxima ( $\lambda_{\max}$ ) entnommen aus den UV-Spektren des DAD, verwendete Software: EZ Chrom Elite Client/Server Version 3.1.3.

## Hochleistungs-Flüssigchromatographie, präparativ

Gerät: LaPrep P110 Preparative HPLC Pump, LaPrep P311 Spectralphotometer, LaPrep P216 Fraction Collector, Säulenrohr Merck: Länge 125 mm, Innendurchmesser: 25 mm, ausgestattet mit einem Merck Selbstfüllstand NW25, Säulenmaterial Merck: LiChrospher® 100 RP-18, 12  $\mu$ m, Fa. Merck, Darmstadt; Probenschleife (max. Injektionsvolumen: 5 mL), Fa. Knauer Berlin.

Probenvorbereitung: Die Probe wird in einem Gemisch aus DMSO und verwendetem Fließmittel zu einem Gesamtvolumen von 4 mL gelöst; *Sandwich*-Injektion.

Elution: Injektionsvolumen: 4 mL Probe und 1 mL DMSO; Flussrate 40 mL/min; Gesamtlaufzeit: 45 min.

Elutionsmittel: Gemische aus Acetonitril und H<sub>2</sub>O (bidest.).

Detektion: UV-Detektor bei 254 nm.

## Infrarotspektroskopie

Thermo Nicolet FT-IR 200, Fa. Nicolet, Madison, WI, USA; die Substanzen wurden als KBr-Presslinge vermessen.

### Inkubationsschüttler

IKA® KS 3000 ic control; Externer Kühler: KV 600 digital - 230 V, IKA®-Werke, Staufen, Deutschland.

### Kernresonanzspektroskopie

Bruker Avance DRX-400 ( $^1\text{H}$ -NMR-Messung: 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ -NMR-Messung: 101 MHz), Bruker Avance III-400 ( $^1\text{H}$ -NMR-Messung: 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ -NMR-Messung: 101 MHz), Bruker Avance II-600 ( $^1\text{H}$ -NMR-Messung: 600 MHz,  $^{13}\text{C}$ -NMR-Messung: 151 MHz), Fa. Bruker, Billerica, MA, USA; Die NMR-Messungen wurden in den NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig durchgeführt.

Lösungsmittel:  $d_6$ -DMSO

Interner Standard: Tetramethylsilan

$^1\text{H}$ -NMR: Angabe der chemischen Verschiebung in ppm nach der  $\delta_{\text{TMS}}$ -Skala (sofern nicht anderes angegeben); Ermittlung der Protonenverhältnisse durch Integration.

$^{13}\text{C}$ -NMR: Angabe der chemischen Verschiebung in ppm nach der  $\delta_{\text{TMS}}$ -Skala (sofern nicht anderes angegeben); Aufnahme der Spektren mit  $^1\text{H}$ -Breitbandentkopplung sowie routinemäßig mit  $^{13}\text{C}$ -135DEPT-Experimenten

Abkürzungen für Signalmultiplizitäten: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, dd = Dublett vom Dublett

### Lösungsmittel

Es wurden ungetrocknete Lösungsmittel verwendet.

### Massenspektroskopie

Die massenspektroskopischen Untersuchungen erfolgten am Institut für Organische Chemie, Technische Universität Braunschweig; Finnigan-MAT 95, Fa. Thermo Finnigan MAT, Bremen.

Elektronenstoß-Ionisation (EI)-MS: Ionisationsenergie 70 eV

Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS): Interner Massenstandard Perfluorkerosin, Hochauflösung des Signals des Molekülradikalkations  $[M]^{+•}$  oder des Signals  $[M-H]^+$ ; angegeben werden berechnete (ber.) und gefundene (gef.) Werte.

Elektrospray-Ionisation (ESI-MS): Die Proben wurden in Methanol unter Zusatz von Tetradecyltrimethylammoniumbromid (0.1 mg/mL) zu einer Konzentration von 50 µg/mL verdünnt. Die Zuführung der Proben erfolgte durch Direktinfusion. Sprühpotential im positiven Modus: 2.3 – 2.8 kV.

### **Mikrowellen-Synthese**

CEM Fokussiertes Mikrowellen<sup>TM</sup> Synthese System, Typ Discover; Chem Driver<sup>TM</sup> Application Software Program und Typ Discover SP; Synergy Software; Reaktionsgefäße: 10 mL mit Teflonseptum (geschlossenes System), Fa. CEM GmbH, Kamp-Lintfort; Jun-Air Kompressor, Blue Line Model 4, Fa. Jun-Air International, Nørresundby, Dänemark.

### **pH-Meter**

632 pH-Meter, Glaselektrode, Fa. Metrohm GmbH und Co. KG, Filderstadt, Deutschland.

### **Schmelzpunktbestimmung (Schmp.)**

Die Bestimmung wurde in offenen Glaskapillaren mit einem Barnstead Electrothermal IA 9100, Fa. Electrothermal Engineering, Southend-on-Sea, Essex, Großbritannien durchgeführt. Falls eine Zersetzung beobachtet wurde, wird dies mit dem Ausdruck Zers. gekennzeichnet.

### **Waagen**

Sartorius MC 5, Sartorius BP 161 P und Sartorius BP 2100 S, Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland.

### **Bezug der Ausgangschemikalien**

Ausgangsstoffe und Reagenzien wurden über Acros Organics (Geel, Belgien), Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) oder Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA) erhalten. 6-Chlorpyrimidin-4,5-diamin wurde über Manchester Organics (Runcorn, Cheshire, UK) und 2-Amino-6-brom-1*H*-purin-6(7*H*)-on über ChemPur (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.



### 8.3 Synthesen und analytische Daten

#### AAV 1: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der Purinderivate **18**

6-Chlorpyrimidin-4,5-diamin (1 Äquivalent) und Ammoniumchlorid (6 Äquivalente) werden in  $\text{POCl}_3$  (10 mL/1.4 mmol 6-Chlorpyrimidin-4,5-diamin) suspendiert. Nach Zusatz des entsprechenden Säurechlorids (1 – 5 Äquivalente) wird während der angegebenen Reaktionszeit auf 100 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Ansatz langsam unter Eiskühlung auf Eiswasser gegeben und mit einer  $\text{NH}_3$ -Lösung (25%) neutralisiert (pH 7 – 8). Der erhaltene Feststoff wird abgesaugt, mit Wasser nachgewaschen und wie angegeben aufgereinigt.

#### AAV 2: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der 1,3,4-Oxadiazol-2-thiole **25**

Das entsprechende Hydrazid (1 Äquivalent) wird unter Zusatz von KOH (1 Äquivalent) in Ethanol (96%) (30 mL/10 mmol Hydrazid) gelöst. Nach Zusatz von  $\text{CS}_2$  (1 – 1.2 Äquivalente) wird der Ansatz mit der angegebenen Reaktionszeit zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch unter vermindertem Druck zur Trockne eingeeengt und der erhaltene Rückstand in Wasser (20 mL/10 mmol Hydrazid) suspendiert. Der nach Zusatz von verdünnter Salzsäure (0.5 mol/L) (10 mL/10 mmol Hydrazid) ausgefallene Feststoff wird abgesaugt und wie angegeben aufgereinigt.

#### AAV 3: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der Testverbindungen **12** - konventionelle Methode

Das Purinderivat (1 Äquivalent) und das 1,3,4-Oxadiazol-2-thiolderivat (1 – 2 Äquivalente) werden unter Zusatz einer Base (1 – 2 Äquivalente) im angegebenen Lösungsmittel suspendiert und bis zur vollständigen Umsetzung des Purinderivates unter Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wird auf Raumtemperatur abgekühlt, der erhaltene Feststoff abgesaugt und wie angegeben aufgereinigt.

#### AAV 4: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der Testverbindungen **12** - Mikrowellen-gestützte Methode (Mikrowelle: Typ Discover)

Das Purinderivat (1 Äquivalent) und das 1,3,4-Oxadiazol-2-thiolderivat (1 – 2 Äquivalente) werden unter Zusatz einer Base (1 – 2 Äquivalente) in DMF (1 – 3 mL)

in ein Mikrowellenreaktionsgefäß gegeben. Folgende Parameter werden für die Reaktion gewählt: Leistung 200 W, *ramp time* 5:00 min, Reaktionszeit 20:00 min, Temperatur 120 °C, Maximaldruck 150 psi. Nach Ende der Reaktion wird der Ansatz auf Wasser (20 mL) gegeben, der ausgefallene Feststoff abgesaugt und wie angegeben aufgereinigt.

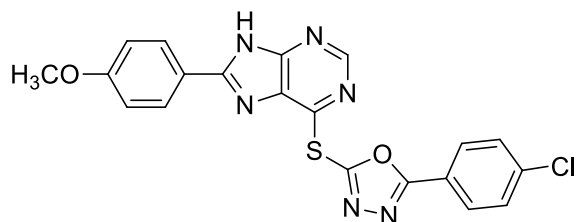
AAV 5: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der Testverbindungen **12**, **13** - Mikrowellen-gestützte Methode (Mikrowelle: Typ Discover SP)

Das Purinderivat (1 Äquivalent) und das 1,3,4-Oxadiazol-2-thiolderivat (1 – 1.3 Äquivalente) werden unter Zusatz einer Base (1 – 1.3 Äquivalente) in DMF (1 – 3 mL) in ein Mikrowellenreaktionsgefäß gegeben. Folgende Parameter werden für die Reaktion gewählt: Leistung 100 W, *ramp time* 5:00 min, Reaktionszeit 30:00 min, Temperatur 120 °C, Maximaldruck 150 psi. Nach Ende der Reaktion wird der Ansatz auf Wasser (20 mL) gegeben, der ausgefallene Feststoff abgesaugt und wie angegeben aufgereinigt.

AAV 6: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der Verbindungen **24a** und **24b**

8-Brom-6-chlor-9*H*-purin-2-amin (1 Äquivalent) und die entsprechende Boronsäure (3 Äquivalente) werden unter Zusatz von K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4 Äquivalente) und Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.1 Äquivalente) in Dioxan/Wasser (3:1, 4 mL/0.8 mmol 8-Brom-6-chlor-9*H*-purin-2-amin) gegeben. Folgende Parameter werden für die Mikrowellenreaktion gewählt: Leistung 100 W, *ramp time* 5:00 min, Reaktionszeit 1 h, Maximaldruck 150 psi, Temperatur 130 °C. Nach beendeter Reaktion wird der Ansatz auf Wasser (10 mL) gegeben und mit 1 N HCl neutralisiert (pH 7 – 8). Der Ansatz wird unter vermindertem Druck zur Trockne eingeengt und der erhaltene Rückstand erneut in Wasser (10 mL) suspendiert. Der erhaltene Feststoff wird abgesaugt und wie angegeben aufgereinigt.

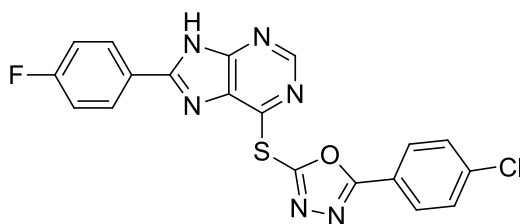
**2-(4-Chlorphenyl)-5-[[8-(4-methoxyphenyl)-9H-purin-6-yl]thio]-1,3,4-oxadiazol (12a)**



Die Verbindung **12a** wurde nach AAV 3 hergestellt. Dazu wurden 6-Chlor-8-(4-methoxyphenyl)-9H-purin (**18b**, 182 mg, 0.697 mmol) und 5-(4-Chlorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25a**, 156 mg, 0.734 mmol) unter Zusatz von Triethylamin (103  $\mu$ L, 0.740 mmol) in Propan-2-ol (15 mL) suspendiert. Der Ansatz wurde für 24 h zum Rückfluss erhitzt. Der erhaltene Feststoff wurde aus Toluol/Ethanol umkristallisiert.

Es wurden 137 mg eines gelblichen Feststoffes (45%) erhalten.

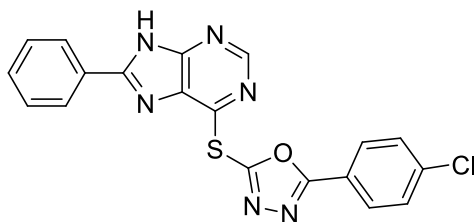
Schmp.: 266 – 267 °C (Zers.); IR (KBr): 3429  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.83 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 6.97 – 7.02 (m, 2H, ArH), 7.68 – 7.73 (m, 2H, ArH), 7.94 – 7.98 (m, 2H, ArH), 8.08 – 8.13 (m, 2H, ArH), 8.66 (s, 1H, ArH), 14.06 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 55.46 ( $\text{CH}_3$ ), 114.4, 128.7, 128.9, 129.8, 151.1 (CH), 120.6, 121.9, 131.1, 137.4, 151.9, 153.1, 153.4, 157.1, 161.8, 166.7 (C);  $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{ClN}_6\text{OS}$  (436.87); ber. C 54.98, H 3.00, N 19.24; gef. C 54.85, H 3.13, N 18.87; MS (EI):  $m/z$  (%) = 436 [ $\text{M}]^{+}$  (9), 394 [ $\text{M}^{+} - 42$ ] (2), 299 [ $\text{M} - \text{C}_7\text{H}_4\text{ClN}]^{+}$  (100); HPLC (isokratisch): 98.9% bei 254 nm und 98.7% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  50:50),  $t_r$  = 7.93 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 260 nm und 323 nm; HPLC (Gradient): 98.8% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 12.45 min,  $t_m$  = 1.25 min.

**2-(4-Chlorphenyl)-5-[[8-(4-fluorphenyl)-9H-purin-6-yl]thio]-1,3,4-oxadiazol (12b)**

Die Verbindung **12b** wurde nach AAV 5 synthetisiert. Dazu wurden 6-Fluor-8-(4-methoxyphenyl)-9H-purin (**18c**, 140 mg, 0.559 mmol) und 5-(4-Chlorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25a**, 130 mg, 0.613 mmol) unter Zusatz von Triethylamin (83  $\mu$ L, 0.600 mmol) in DMF (2 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde aus Toluol/Ethanol umkristallisiert.

Es wurden 121 mg eines gelblichen Feststoffes (51%) erhalten.

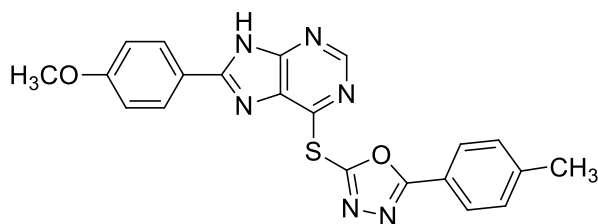
Schmp.: 272 – 273 °C (Zers.); IR (KBr): 3427  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 399.8 MHz):  $\delta$  (ppm) = 7.28 – 7.37 (m, 2H, ArH), 7.66 – 7.74 (m, 2H, ArH), 8.03 – 8.15 (m, 4H, ArH), 8.70 (s, 1H, ArH), 14.25 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 100.5 MHz):  $\delta$  (ppm) = 116.2 (d,  $J$  = 22.08 Hz), 128.6, 129.5 (m), 129.8, 151.5 (CH), 121.8, 124.9 (d,  $J$  = 3.14 Hz), 137.4, 152.5, 152.8, 153.0, 157.1, 163.9 (d,  $J$  = 250.1 Hz), 166.6 (C) (ein C nicht detektierbar);  $\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{ClFN}_6\text{OS}$  (424.84); ber. C 53.72, H 2.37, N 19.78, gef. C 54.06, H 2.37, N 19.40; MS (EI):  $m/z$  (%) = 424  $[\text{M}]^{+*}$  (4), 482  $[\text{M}^{+*} - 42]$  (1), 287  $[\text{M} - \text{C}_7\text{H}_4\text{ClN}]^{+*}$  (100); HPLC (isokratisch): 99.3% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  50:50),  $t_r$  = 7.01 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 244 nm und 310 nm; HPLC (Gradient): 98.4% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 12.78 min,  $t_m$  = 1.25 min.

**2-(4-Chlorphenyl)-5-[(8-phenyl-9H-purin-6-yl)thio]-1,3,4-oxadiazol (12c)**

Die Verbindung **12c** wurde nach AAV 4 synthetisiert. Dazu wurden 5-(4-Chlorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25a**, 147 mg, 0.691 mmol) und 6-Chlor-8-phenyl-9H-purin (**18a**, 146 mg, 0.633 mmol) unter Zusatz von DIEPA (119  $\mu$ L, 0.700 mmol) in DMF (2 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde aus Toluol/Ethanol (96%) umkristallisiert.

Es wurden 81.9 mg eines gelblichen Feststoffes (32%) erhalten.

Schmp.: 270 – 271 °C (Zers.); IR (KBr): 3400  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 7.41 – 7.47 (m, 2H, ArH), 7.50 – 7.55 (m, 1H, ArH), 7.74 – 7.68 (m, 2H, ArH), 7.98 – 8.03 (m, 2H, ArH), 8.09 – 8.14 (m, 2H, ArH), 8.70 (s, 1H, ArH), 14.24 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 126.9, 128.6, 128.9, 129.7, 131.4, 151.4 (CH), 121.8, 128.1, 130.9, 137.3, 152.85, 152.88, 153.2, 157.1, 166.6 (C);  $\text{C}_{19}\text{H}_{11}\text{ClN}_6\text{OS}$  (406.85); ber. C 56.09, H 2.73, N 20.66, gef. C 56.42 H 2.65, N 20.30; MS (EI):  $m/z$  (%) = 406  $[\text{M}]^{+}$  (4), 364  $[\text{M}^{+} - 42]$  (2), 269  $[\text{M} - \text{C}_7\text{H}_4\text{ClN}]^{+}$  (100); HPLC (isokratisch): 97.9% bei 254 nm und 97.9% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  50:50),  $t_r$  = 7.08 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 245 nm, 266 nm und 310 nm; HPLC (Gradient): 97.9% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 12.5 min,  $t_m$  = 1.25 min.

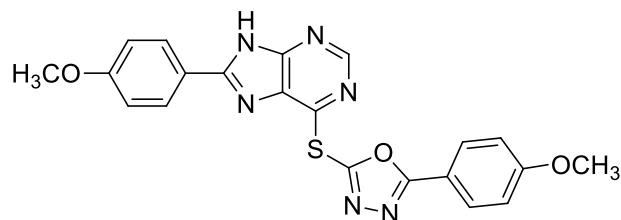
**2-([8-(4-Methoxyphenyl)-9*H*-purin-6-yl]thio)-5-(*p*-tolyl)-1,3,4-oxadiazol (12d)**

Die Verbindung **12d** wurde nach AAV 5 synthetisiert. Dazu wurden 6-Chlor-8-(4-methoxyphenyl)-9*H*-purin (**18b**, 170 mg, 0.651 mmol) und 5-(*p*-Tolyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25f**, 138 mg, 0.718 mmol) unter Zusatz von Triethylamin (98  $\mu$ L, 0.708 mmol) in DMF (3 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde aus Ethanol umkristallisiert.

Es wurden 163 mg eines gelblichen Feststoffes (60%) erhalten.

Schmp.: 239 – 241 °C (Zers.); IR (KBr): 3428  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.96 – 7.01 (m, 2H, ArH), 7.41 – 7.47 (m, 2H, ArH), 7.95 – 8.01 (m, 4H, ArH), 8.65 (s, 1H, ArH), 14.05 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 21.18, 55.44 (CH<sub>3</sub>), 114.4, 126.8, 128.8, 130.1, 151.1 (CH), 120.3, 120.6, 131.1, 142.9, 152.0, 153.0, 153.4, 156.5, 161.7, 167.6 (C); C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S (416.46); ber. C 60.56, H 3.87, N 20.18, gef. C 60.33, H 3.71, N 20.19; MS (EI):  $m/z$  (%) = 416 [ $\text{M}^{+}$ ] (14), 374 [ $\text{M}^{+} - 42$ ] (3), 299 [ $\text{M} - \text{C}_8\text{H}_7\text{N}$ ] (100), 117 (47); HPLC (isokratisch): 95.4% bei 254 nm und 95.3% bei 280 nm (ACN/H<sub>2</sub>O 50:50),  $t_r$  = 6.41 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 260 nm und 323 nm; HPLC (Gradient): 98.7% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 12.12 min,  $t_m$  = 1.25 min.

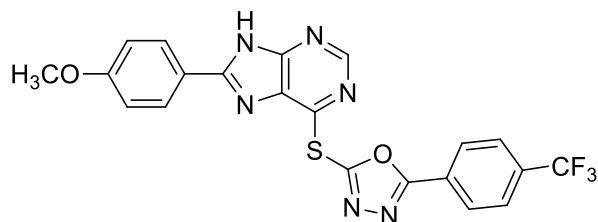
**2-(4-Methoxyphenyl)-5-[[8-(4-methoxyphenyl)-9H-purin-6-yl]thio]-1,3,4-oxadiazol (12e)**



Die Verbindung **12e** wurde nach AAV 3 hergestellt. Dazu wurden 6-Chlor-8-(4-methoxyphenyl)-9H-purin (**18b**, 184 mg, 0.707 mmol) und 5-(4-Methoxy)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25e**, 154 mg, 0.741 mmol) unter Zusatz von Triethylamin (98  $\mu$ L, 0.707 mmol) in Propan-2-ol (15 mL) suspendiert. Der Ansatz wurde für 40 h zum Rückfluss erhitzt. Der erhaltene Feststoff wurde aus Toluol/Ethanol umkristallisiert.

Es wurden 135 mg eines gelblichen Feststoffes (44%) erhalten.

Schmp.: 256 – 257 °C (Zers.); IR (KBr): 3435  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.98 – 7.03 (m, 2H, ArH), 7.13 – 7.21 (m, 2H, ArH), 7.97 – 8.01 (m, 2H, ArH), 8.01 – 8.06 (m, 2H, ArH), 8.64 (s, 1H, ArH), 14.05 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 55.45, 55.59 (CH<sub>3</sub>), 114.4, 115.0, 128.8, 128.9, 151.1 (CH), 115.4, 120.7, 129.2, 151.9, 153.1, 153.6, 156.1, 161.7, 162.5, 167.5 (C); C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S (432.46); ber. C 58.32, H 3.73, N 19.43; gef. C 58.42, H 3.78, N 19.22; MS (EI):  $m/z$  (%) = 432 [ $\text{M}]^{+}$  (9), 390 [ $\text{M}^{+} - 42$ ] (3); 299 [ $\text{M} - \text{C}_8\text{H}_7\text{NO}]^{+}$  (100), 133 (69); HPLC (isokratisch): 98.4% bei 254 nm und 98.8% bei 280 nm (ACN/H<sub>2</sub>O 45:55),  $t_r$  = 6.89 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 289 nm und 323 nm; HPLC (Gradient): 98.7% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 11.47 min,  $t_m$  = 1.25 min.

**2-[[8-(4-Methoxyphenyl)-9H-purin-6-yl]thio]-5-[4-(trifluormethyl)phenyl]-1,3,4-oxadiazol (12f)**

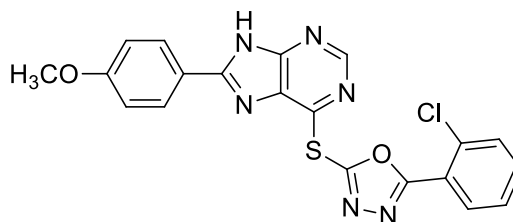
Die Verbindung **12f** wurde nach AAV 3 synthetisiert. Dazu wurden 6-Chlor-8-(4-methoxyphenyl)-9H-purin (**18b**, 183 mg, 0.702 mmol) und 5-[4-(Trifluormethyl)phenyl]-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25b**, 288 mg, 1.17 mmol) unter Zusatz von Triethylamin (104  $\mu$ L, 0.750 mmol) in Propan-2-ol (10 mL) suspendiert und für 15 h zum Rückfluss erhitzt. Der erhaltene Feststoff wurde aus Ethanol umkristallisiert.

Es wurden 127 mg eines gelblichen Feststoffes (39%) erhalten.

Schmp.: 242 – 243 °C (Zers.); IR (KBr): 3431  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.81 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 6.93 – 6.99 (m, 2H, ArH), 7.90 – 7.96 (m, 2H, ArH), 7.99 – 8.04 (m, 2H, ArH), 8.30 – 8.35 (m, 2H, ArH), 8.67 (s, 1H, ArH), 14.07 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 55.42 ( $\text{CH}_3$ ), 114.4, 126.6 (m), 127.8, 128.8, 151.1 (CH), 120.5, 123.7 (q,  $J$  = 272.7 Hz), 126.8, 131.1, 132.1 (q,  $J$  = 32.3 Hz), 151.8, 153.1, 153.5, 157.9, 161.8, 166.3 (C) (Referenziert auf DMSO = 2.50 ppm);  $\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_2\text{S}$  (470.43); ber. C 53.62, H 2.79, N 17.86, gef. C 53.53, H 2.68, N 17.94; MS (EI):  $m/z$  (%) = 470 [ $\text{M}]^{+}$  (22), 428 [ $\text{M}^{+} - 42$ ] (5), 299 [ $\text{M} - \text{C}_8\text{H}_4\text{F}_3\text{N}]^{+}$  (100); HPLC (isokratisch): 98.5% bei 254 nm und 97.5% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  60:40),  $t_r$  = 4.17 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 256 nm und 323 nm; HPLC (Gradient): 98.5% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 12.57 min,  $t_m$  = 1.25 min.



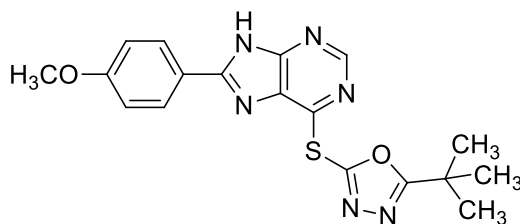
**2-(2-Chlorphenyl)-5-[[8-(4-methoxyphenyl)-9H-purin-6-yl]thio]-1,3,4-oxadiazol (12g)**



Die Verbindung **12g** wurde nach AAV 3 hergestellt. Dazu wurden 6-Chlor-8-(4-methoxyphenyl)-9H-purin (**18b**, 192 mg, 0.738 mmol) und 5-(2-Chlorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25c**, 158 mg, 0.743 mmol) unter Zusatz von Triethylamin (103  $\mu$ L, 0.743 mmol) in *n*-Butanol (15 mL) suspendiert. Der Ansatz wurde für 15 h zum Rückfluss erhitzt. Der erhaltene Feststoff wurde aus Toluol/Ethanol umkristallisiert.

Es wurden 161 mg eines gelblichen Feststoffes (50%) erhalten.

Schmp.: 232 – 233 °C (Zers.); IR (KBr): 3430  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.83 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.01 – 7.06 (m, 2H, ArH), 7.58 (td,  $J$  = 1.25 Hz, 7.66 Hz, 1H, ArH), 7.67 (td,  $J$  = 1.67 Hz, 7.73 Hz, 1H, ArH), 7.75 (dd,  $J$  = 1.21 Hz, 8.18 Hz, 1H, ArH), 7.99 – 8.03 (m, 2H, ArH), 8.06 (dd,  $J$  = 1.67 Hz, 7.79 Hz, 1H, ArH), 8.67 (s, 1H, ArH), 14.08 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 55.50 ( $\text{CH}_3$ ), 114.5, 128.1, 128.9, 131.4, 131.5, 133.8, 151.1 (CH), 120.6, 122.0, 131.3, 131.9, 151.5, 153.1, 153.6, 157.7, 161.8, 165.6 (C);  $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{ClN}_6\text{O}_2\text{S}$  (436.87); ber. C 54.98, H 3.00, N 19.24, gef. C 54.94 H 3.01, N 19.01; MS (EI):  $m/z$  (%) = 436  $[\text{M}]^{+*}$  (11), 299  $[\text{M} - \text{C}_7\text{H}_4\text{ClN}]^{+*}$  (100), HPLC (isokratisch): 99.5% bei 254 nm und 99.4% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  46:54),  $t_r$  = 7.71 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 257 nm und 324 nm; HPLC (Gradient): 99.6% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 11.78 min,  $t_m$  = 1.25 min.

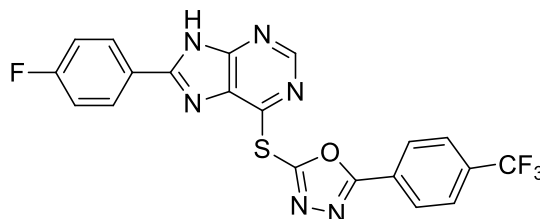
**2-(*tert*-Butyl)-5-{[8-(4-methoxyphenyl)-9*H*-purin-6-yl]thio}-1,3,4-oxadiazol (12i)**

Die Verbindung **12i** wurde nach AAV 5 synthetisiert. Dazu wurden 6-Chlor-8-(4-methoxyphenyl)-9*H*-purin (**18b**, 194 mg, 0.744 mmol) und 5-(*tert*-Butyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25m**, 130 mg, 0.822 mmol) unter Zusatz von Triethylamin (111  $\mu$ L, 0.800 mmol) in DMF (3 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde mittels Säulenchromatographie (Fließmittel: EA/PE 2:1) aufgereinigt.

Es wurden 82 mg eines farblosen Feststoffes (29%) erhalten.

Schmp.: 208 – 210 °C (Zers.); IR (KBr): 3432  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1.34 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 3.86 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.11 – 7.18 (m, 2H, ArH), 8.05 – 8.10 (m, 2H, ArH), 8.65 (s, 1H, ArH), 14.07 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 27.61, 55.53 ( $\text{CH}_3$ ), 114.6, 129.0, 151.0 (CH), 32.33, 120.6, 131.3, 151.7, 153.0, 153.5, 156.5, 161.9, 176.4 (C);  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}$  (382.44); ber. C 56.53, H 4.74, N 21.97, gef. C 56.30, H 4.70, N 21.88; MS (EI):  $m/z$  (%) = 382  $[\text{M}]^{++}$  (41), 303  $[\text{M}^{++} - 42]$  (7), 299  $[\text{M} - \text{C}_5\text{H}_9\text{N}]^{++}$  (100); HPLC (isokratisch): 97.7% bei 254 nm und 94.4% bei 280 nm (ACN/Puffer 50:50),  $t_r$  = 3.85 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 256 nm und 320 nm; HPLC (Gradient): 96.9% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 10.94 min,  $t_m$  = 1.25 min.

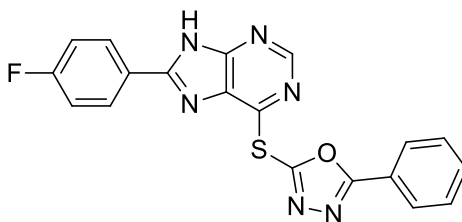
**2-[[8-(4-Fluorphenyl)-9*H*-purin-6-yl]thio]-5-[4-(trifluormethyl)phenyl]-1,3,4-oxadiazol (12j)**



Die Verbindung **12j** wurde nach AAV 3 synthetisiert. Dazu wurden 6-Chlor-8-(4-fluorphenyl)-9*H*-purin (**18c**, 183 mg, 0.735 mmol) und 5-(4-Trifluormethyl)phenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25b**, 198 mg, 0.804 mmol) unter Zusatz von Triethylamin (111  $\mu$ L, 0.801 mmol) in Propan-2-ol (10 mL) suspendiert. Der Ansatz wurde für 15 h zum Rückfluss erhitzt. Der erhaltene Feststoff wurde aus Toluol/Ethanol umkristallisiert.

Es wurden 162 mg eines gelblichen Feststoffes (48%) erhalten.

Schmp.: 244 – 245 °C (Zers.); IR (KBr): 3435  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 Hz):  $\delta$  (ppm) = 7.27 – 7.34 (m, 2H, ArH), 7.97 – 8.03 (m, 2H, ArH), 8.02 – 8.07 (m, 2H, ArH), 8.29 – 8.34 (m, 2H, ArH), 8.70 (s, 1H, ArH), 14.27 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 116.2 (d,  $J$  = 22.19 Hz), 126.6 (m), 127.8, 129.5 (d,  $J$  = 9.01 Hz), 151.5 (CH), 123.6 (q,  $J$  = 272.7 Hz), 124.9 (m), 128.5 (d,  $J$  = 104.6 Hz), 131.0, 132.1 (q,  $J$  = 32.33 Hz), 152.5, 152.7, 153.0, 157.8, 163.9 (d,  $J$  = 249.8 Hz), 166.4 (C); ber. C 52.40, H 2.20, N 18.33, gef. C 52.4, H 2.11, N 18.34; MS (EI):  $m/z$  (%) = 458 [ $\text{M}]^{+}$  (8), 416 [ $\text{M}^{+} - 42$ ] (3), 287 [ $\text{M} - \text{C}_8\text{H}_4\text{F}_3\text{N}$ ] $^{+}$  (100);  $\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{F}_4\text{N}_6\text{OS}$  (458.39); HPLC (isokratisch): 99.4 % bei 254 nm und 99.2 % bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  60:40),  $t_r$  = 4.57 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 244 nm und 310 nm; HPLC (Gradient): 98.2% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 12.83 min,  $t_m$  = 1.25 min.

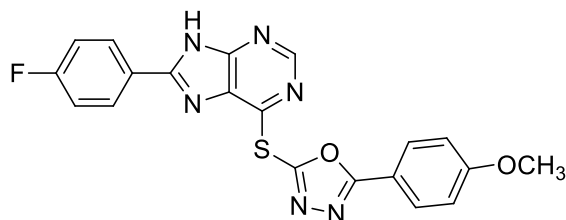
**2-([8-(4-Fluorphenyl)-9H-purin-6-yl]thio)-5-phenyl-1,3,4-oxadiazol (12k)**

Die Verbindung **12k** wurde nach AAV 5 hergestellt. Dazu wurden 6-Chlor-8-(4-fluorphenyl)-9H-purin (**18c**, 171 mg, 0.689 mmol) und 5-Phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25d**, 140 mg, 0.788 mmol) unter Zusatz von Triethylamin (104  $\mu$ L, 0.750 mmol) in DMF (3 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde aus Ethanol umkristallisiert.

Es wurden 177 mg eines gelblichen Feststoffes (66%) erhalten.

Schmp.: 242 – 243 °C (Zers.); IR (KBr): 3436  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 7.26 – 7.33 (m, 2H, ArH), 7.61 – 7.67 (m, 2H, ArH), 7.65 – 7.72 (m, 1H, ArH), 8.04 – 8.09 (m, 2H, ArH), 8.08 – 8.13 (m, 2H, ArH), 8.70 (s, 1H, ArH), 14.25 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 116.2 (d,  $J$  = 22.10 Hz), 126.8, 129.5 (d,  $J$  = 8.99 Hz), 129.6, 132.7, 151.5 (CH), 123.0, 124.9 (d,  $J$  = 2.90 Hz), 130.9, 152.4, 152.94, 152.97, 156.8, 163.9 (d,  $J$  = 250.1 Hz), 167.5 (C);  $\text{C}_{19}\text{H}_{11}\text{FN}_6\text{OS}$  (390.39); ber. C 58.45, H 2.84, N 21.53, gef. C 58.08, H 2.69, N 21.84; MS (EI):  $m/z$  (%) = 390  $[\text{M}]^{+}$  (9), 348  $[\text{M}^{+} - 42]$  (4), 287  $[\text{M} - \text{C}_7\text{H}_5\text{N}]^{+}$  (100); HPLC (isokratisch): 96.6% bei 254 nm und 95.9% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  45:55),  $t_r$  = 3.71 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 243 nm und 313 nm; HPLC (Gradient): 96.3% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 11.69 min,  $t_m$  = 1.25 min.

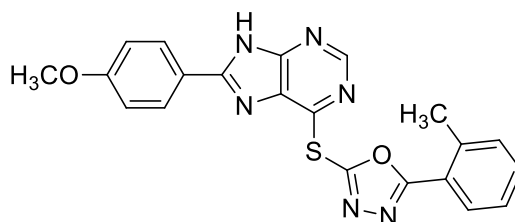
**2-([8-(4-Fluorphenyl)-9H-purin-6-yl]thio)-5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazol (12I)**



Die Verbindung **12I** wurde nach AAV 3 synthetisiert. Dazu wurden 6-Chlor-8-(4-fluorphenyl)-9H-purin (**18c**, 143 mg, 0.575 mmol) und 5-(4-Methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25e**, 138 mg, 0.663 mmol) unter Zusatz von Triethylamin (90  $\mu$ L, 0.649 mmol) in Butan-1-ol (15 mL) suspendiert. Der Ansatz wurde für 15 h zum Rückfluss erhitzt. Der erhaltene Feststoff wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Fließmittel: Ethanol) aufgereinigt.

Es wurden 67.4 mg eines gelblichen Feststoffes (28%) erhalten.

Schmp.: 242 – 243 °C (Zers.); IR (KBr): 3429  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.85 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.13 – 7.19 (m, 2H, ArH), 7.29 – 7.35 (m, 2H, ArH), 7.99 – 8.05 (m, 2H, ArH), 8.06 – 8.12 (m, 2H, ArH), 8.68 (s, 1H, ArH), 14.23 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 55.59 ( $\text{CH}_3$ ), 115.1, 116.2 (d,  $J$  = 22.1 Hz), 128.8, 129.6 (d,  $J$  = 9.01 Hz), 151.5 (CH), 115.3, 125.0 (d,  $J$  = 2.94 Hz), 131.0, 152.5, 153.0, 156.0, 162.5, 163.9 (d,  $J$  = 250.1 Hz), 167.5 (C) (ein C nicht detektierbar); (Referenziert auf DMSO = 2.50 ppm);  $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{FN}_6\text{O}_2\text{S}$  (420.42); ber. C 57.14, H 3.12, N 19.99, gef. C 57.01, H 3.04, N 19.60; MS (EI):  $m/z$  (%) = 420  $[\text{M}]^{+}$  (6), 387  $[\text{M}^{+} - 42]$  (2), 287  $[\text{M} - \text{C}_8\text{H}_7\text{NO}]^{+}$  (100), 133 (70); HPLC (isokratisch): 99.1% bei 254 nm und 99.1% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  50:50),  $t_r$  = 4.96 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 242 nm, 287 nm und 307 nm; HPLC (Gradient): 99.0 % bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 11.61 min,  $t_m$  = 1.25 min.

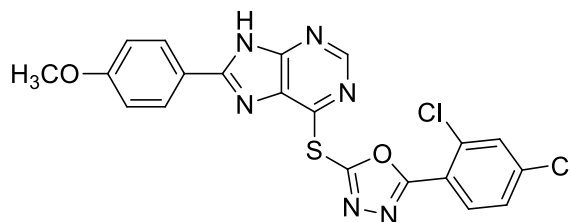
**2-[[8-(4-Methoxyphenyl)-9*H*-purin-6-yl]thio]-5-(*o*-tolyl)-1,3,4-oxadiazol (12m)**

Die Verbindung **12m** wurde nach AAV 4 synthetisiert. Dazu wurden 6-Chlor-8-(4-methoxyphenyl)-9*H*-purin (**18b**, 139 mg, 0.533 mmol) und 5-(*o*-Tolyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (113 mg, 0.590 mmol) unter Zusatz von Triethylamin (82  $\mu$ L, 0.592 mmol) in DMF (3 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde aus Ethanol umkristallisiert.

Es wurden 55.5 mg eines gelblichen Feststoffes (25%) erhalten.

Schmp.: 206 – 207 °C (Zers.); IR (KBr): 3423  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.96 – 7.02 (m, 2H, ArH), 7.38 – 7.45 (m, 1H, ArH), 7.46 – 7.52 (m, 1H, ArH), 7.50 – 7.58 (m, 1H, ArH), 7.92 – 7.96 (m, 1H, ArH), 7.96 – 8.01 (m, 2H, ArH), 8.66 (s, 1H, ArH), 14.07 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 21.36, 55.46 (CH<sub>3</sub>), 114.4, 126.9, 128.8, 129.0, 131.9, 132.1, 151.1 (CH), 120.6, 122.1, 131.2, 137.8, 151.9, 153.0, 153.5, 156.6, 161.8, 167.8 (C); C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S (416.46); ber. C 60.56, H 3.87, N 20.18, gef. C 60.37, H 3.69, N 20.17; MS (EI):  $m/z$  (%) = 416 [M]<sup>++</sup> (16), 374 [M<sup>++</sup> – 42] (5), 299 [M – C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N]<sup>++</sup> (100), 117 (59); HPLC (isokratisch): 98.2% bei 254 nm und 97.4% bei 280 nm (ACN/H<sub>2</sub>O 50:50),  $t_r$  = 6.44 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 257 nm und 323 nm; HPLC (Gradient): 98.0% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 12.10 min,  $t_m$  = 1.25 min.

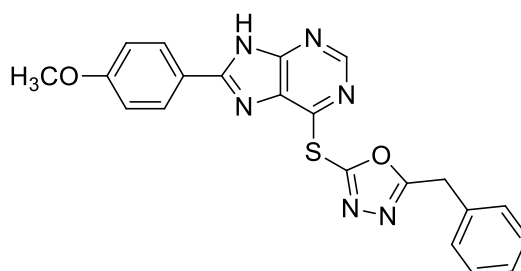
**2-(2,4-Dichlorphenyl)-5-[[8-(4-methoxyphenyl)-9*H*-purin-6-yl]thio]-1,3,4-oxadiazol (12n)**



Die Verbindung **12n** wurde nach AAV 5 synthetisiert. Dazu wurden 5-(2,4-Dichlorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25h**, 198 mg, 0.801 mmol) und 6-Chlor-8-(4-methoxyphenyl)-9*H*-purin (**18b**, 197 mg, 0.757 mmol) unter Zusatz von DIPEA (119  $\mu$ L, 0.700 mmol) in DMF (3 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Fließmittel: Ethylacetat) aufgereinigt.

Es wurden 39.2 mg eines gelblichen Feststoffes (11%) erhalten.

Schmp.: 275 – 276 °C (Zers.); IR (KBr): 3433  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.84 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.02 – 7.07 (m, 2H, ArH), 7.67 (dd,  $J$  = 8.49 Hz, 2.09 Hz, 1H, ArH), 7.97 (d,  $J$  = 2.11 Hz, 1H, ArH), 7.98 – 8.02 (m, 2H, ArH), 8.07 (d,  $J$  = 8.51 Hz, 1H, ArH), 8.67 (s, 1H, ArH), 14.08 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 55.48 ( $\text{CH}_3$ ), 114.5, 128.4, 128.8, 131.1, 132.5 (CH), 120.6, 120.9, 133.0, 137.7, 151.09, 151.11, 151.4, 153.6, 157.8, 161.8, 164.9 (C) (ein CH nicht detektierbar);  $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_2\text{S}$  (471.32); ber. C 50.97, H 2.57, N 17.83, gef. C 51.20, H 2.16, N 17.59; MS (EI):  $m/z$  (%) = 470  $[\text{M}]^{+}$  (9), 299  $[\text{M} - \text{C}_7\text{H}_3\text{Cl}_2\text{N}]^{+}$  (100), 171 (65); HPLC (isokratisch): 98.9% bei 254 nm und 99.1% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  60:40),  $t_r$  = 4.80 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 258 nm und 323 nm; HPLC (Gradient): 96.5% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 13.1 min,  $t_m$  = 1.25 min.

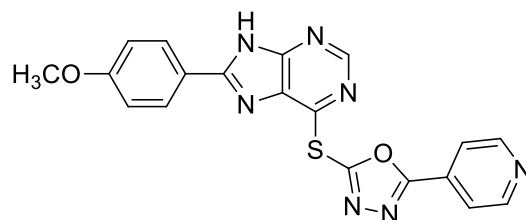
**2-Benzyl-5-[[8-(4-methoxyphenyl)-9H-purin-6-yl]thio]-1,3,4-oxadiazol (12o)**

Verbindung **12o** wurde nach AAV 4 synthetisiert. Dazu wurden 5-Benzyl-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25i**, 96.9 mg, 0.504 mmol) und 6-Chlor-8-(4-methoxyphenyl)-9H-purin (**18b**, 112 mg, 0.430 mmol) unter Zusatz von DIPEA (83  $\mu$ L, 0.488 mmol) in DMF (1 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde aus Toluol/Ethanol (96%) umkristallisiert.

Es wurden 47.9 mg eines gelblichen Feststoffes (27%) erhalten.

Schmp.: 202 – 205 °C (Zers.); IR (KBr): 3423  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.87 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4.41 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.11 – 7.16 (m, 2H, ArH), 7.22 – 7.34 (m, 5H, ArH), 8.06 – 8.11 (m, 2H, ArH), 8.61 (s, 1H, ArH), 14.07 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 30.81 ( $\text{CH}_3$ ), 55.42 ( $\text{CH}_2$ ), 114.5, 127.1, 128.6, 128.7, 128.9, 151.1 (CH), 120.6, 131.3, 133.9, 151.2, 152.8, 153.6, 156.9, 161.8, 169.2 (C);  $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}$  (416.46); ber. C 60.56, H 3.87, N 20.18, gef. C 60.20, H 3.80, N 19.88; MS (EI):  $m/z$  (%) = 416 [ $\text{M}]^{++}$  (35), 374 [ $\text{M}^{++} - 42$ ] (6), 299 [ $\text{M} - \text{C}_8\text{H}_7\text{N}]^{++}$  (77), 258 (46), 91 (100); HPLC (isokratisch): 97.7% bei 254 nm und 95.5% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  50:50),  $t_r$  = 3.48 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 316 nm und 255 nm; HPLC (Gradient): 97.0% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 11.08 min,  $t_m$  = 1.25 min.

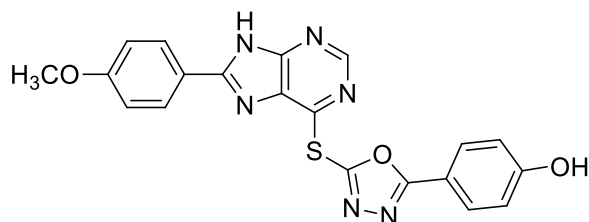


**2-([8-(4-Methoxyphenyl)-9H-purin-6-yl]thio)-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol (12p)**

Die Verbindung **12p** wurde nach AAV 4 synthetisiert. Dazu wurden 5-(Pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25k**, 144 mg, 0.804 mmol) und 6-Chlor-8-(4-methoxyphenyl)-9H-purin (**18b**, 182 mg, 0.700 mmol) unter Zusatz von DIPEA (136  $\mu$ L, 0.800 mmol) in DMF (2 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde aus Toluol/Ethanol umkristallisiert.

Es wurden 202 mg eines gelblichen Feststoffes (72%) erhalten.

Schmp.: 256 – 257 °C (Zers.); IR (KBr): 3431  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.82 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 6.96 – 7.02 (m, 2H, ArH), 7.93 – 7.97 (m, 2H, ArH), 8.01 – 8.06 (m, 2H, ArH), 8.66 (s, 1H, ArH), 8.84 – 8.88 (m, 2H, ArH), 14.07 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 55.47 ( $\text{CH}_3$ ), 114.4, 120.3, 128.8, 151.1, 151.2 (CH), 120.6, 130.0, 131.1, 153.7, 158.4, 161.8, 165.9 (C) (zwei C nicht detektierbar);  $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{N}_7\text{O}_2\text{S}$  (403.42); MS (EI):  $m/z$  (%) = 403  $[\text{M}]^{++}$  (35), 361  $[\text{M}^{+} - 42]$ , 299  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_4\text{N}_2]^{++}$  (100); HRMS (EI):  $m/z$   $[\text{M}]^{++}$  ber. 403.08459, gef. 403.08508; HPLC (isokratisch): 99.1% bei 254 nm und 99.8% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  40:60),  $t_r$  = 4.15 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 255 nm und 324 nm; HPLC (Gradient): 99.2% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 9.96 min,  $t_m$  = 1.25 min.

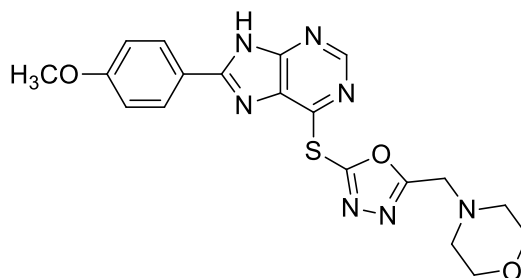
**4-(5-[[8-(4-Methoxyphenyl)-9H-purin-6-yl]thio]-1,3,4-oxadiazol-2-yl)phenol (12q)**

Die Verbindung **12q** wurde nach AAV 5 synthetisiert. Dazu wurden 6-Chlor-8-(4-methoxyphenyl)-9H-purin (**18b**, 155 mg, 0.593 mmol) und 4-(5-Mercapto-1,3,4-oxadiazol-2-yl)phenol (**25g**, 146 mg, 0.750 mmol) unter Zusatz von Triethylamin (104  $\mu$ L, 0.750 mmol) in DMF (2 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde aus einem Ethanol/Toluol-Gemisch und tropfenweisen Zusatz von DMF umkristallisiert.

Es wurden 53.2 mg eines gelblichen Feststoffes (21%) erhalten.

Schmp.: 279 – 280°C (Zers.); IR (KBr): 3414  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.83 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 6.95 – 7.02 (m, 4H, ArH), 7.89 – 7.95 (m, 2H, ArH), 7.97 – 8.02 (m, 2H, ArH), 8.64 (s, 1H, ArH), 10.43 (s, 1H, OH), 14.04 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 55.46 ( $\text{CH}_3$ ), 114.4, 116.3, 128.86, 128.92, 151.3 (CH), 113.8, 120.6, 131.1, 152.2, 153.0, 153.4, 155.7, 161.3, 161.7, 167.8 (C);  $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{O}_3\text{S}$  (418.43); ber. C 57.41, H 3.37, N 20.08, gef. C 57.24, H 3.28, N 19.79; MS (EI):  $m/z$  (%) = 418 [ $\text{M}]^{+*}$  (8), 376 [ $\text{M}^{+*} - 42$ ] (2), 299 [ $\text{M} - \text{C}_7\text{H}_5\text{NO}]^{+*}$  (100), 119 (45); HPLC (isokratisch): 98.5% bei 254 nm und 98.2% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  40:60),  $t_r$  = 3.56 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 292 nm und 321 nm; HPLC (Gradient): 97.4% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 9.84 min,  $t_m$  = 1.25 min.

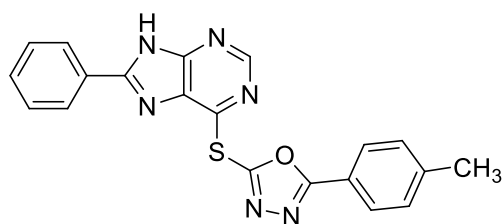
**4-[(5-{[8-(4-Methoxyphenyl)-9H-purin-6-yl]thio}-1,3,4-oxadiazol-2-yl)methyl]morpholin (12r)**



Die Verbindung **12r** wurde nach AAV 3 synthetisiert. Dazu wurden 6-Chlor-8-(4-methoxyphenyl)-9H-purin (**18b**, 170 mg, 0.653 mmol) und 5-(Morpholinomethyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25l**, 112 mg, 0.704 mmol) unter Zusatz von Triethylamin (98  $\mu$ L, 0.707 mmol) in Butan-1-ol (10 mL) suspendiert. Der Ansatz wurde für 15 h zum Rückfluss erhitzt und anschließend unter vermindertem Druck eingeeengt. Der erhaltene Feststoff wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Fließmittel: Ethylacetat) aufgereinigt und anschließend aus Ethanol umkristallisiert. Da die Reinheit noch nicht ausreichend war, erfolgte eine Aufreinigung mittels präparativer HPLC (Fließmittel: ACN/H<sub>2</sub>O 30:70).

Es wurden 51 mg eines farblosen Feststoffes (18%) erhalten.

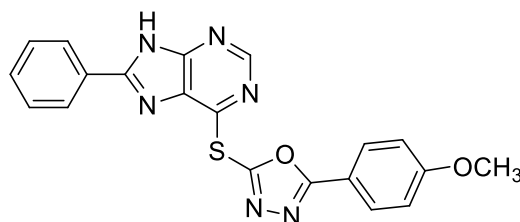
Schmp.: 221 – 222 °C (Zers.); IR (KBr): 3430 cm<sup>-1</sup> (NH); <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.43 – 2.48 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.43 – 3.48 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.90 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.10 – 7.16 (m, 2H, ArH), 8.08 – 8.13 (m, 2H, ArH), 8.58 (s, 1H, ArH), 14.07 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 55.46 (CH<sub>3</sub>), 51.39, 52.29, 65.85 (CH<sub>2</sub>), 144.5, 128.9, 150.8 (CH), 121.4, 131.6, 150.3, 154.2, 154.9, 157.7, 161.7, 167.2 (C); C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S (425.46); MS (EI): *m/z* (%) = 425 [M]<sup>+</sup> (1) 340 (83), 258 (100); HRMS (ESI): *m/z* [M+Na]<sup>++</sup>; ber. 448.11623, gef. 448.11657; HPLC (isokratisch): 99.4% bei 254 nm und 99.6% bei 280 nm (ACN/H<sub>2</sub>O 30:70), *t<sub>r</sub>* = 3.31 min, *t<sub>m</sub>* = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 256 nm und 323 nm; HPLC (Gradient): 99.5% bei 254 nm (Methode A), *t<sub>r</sub>* = 9.89 min, *t<sub>m</sub>* = 1.25 min.

**2-[(8-Phenyl-9*H*-purin-6-yl)thio]-5-(*p*-tolyl)-1,3,4-oxadiazol (**12s**)**

Die Verbindung **12s** wurde nach AAV 4 synthetisiert. Dazu wurden 5-(4-Methylphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25f**, 157 mg, 0.817 mmol) und 6-Chlor-8-phenyl-9*H*-purin (**18a**, 135 mg, 0.587 mmol) unter Zusatz von DIPEA (136  $\mu$ L, 0.806 mmol) in DMF (1.5 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde in Ethylacetat (150 mL) gelöst und mit einer mit DIPEA alkalisierten wässrigen Lösung (3 x 70 mL) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Der erhaltene Feststoff wurde aus Toluol umkristallisiert.

Es wurden 104 mg eines gelblichen Feststoffes (46%) erhalten.

Schmp.: 246 – 247 °C (Zers.); IR (KBr): 3430  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.41 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.40 – 7.47 (m, 4H, ArH), 7.49 – 7.54 (m, 1H, ArH), 7.97 – 8.00 (m, 2H, ArH), 8.00 – 8.05 (m, 2H, ArH), 8.70 (s, 1H, ArH), 14.24 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 21.09 ( $\text{CH}_3$ ), 126.7, 126.9, 128.9, 130.0, 131.3, 151.4 (CH), 120.2, 128.1, 130.9, 142.8, 152.8, 153.0, 153.2, 156.3, 167.5 (C);  $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{OS}$  (386.43); MS (EI):  $m/z$  (%) = 386 [ $\text{M}]^{++}$  (7), 344 [ $\text{M}^{++} - 42$ ] (3), 269 [ $\text{M} - \text{C}_8\text{H}_7\text{N}$ ] $^{++}$  (100) 117 (46); HRMS (EI):  $m/z$  [ $\text{M}]^{++}$  ber. 386.09443, gef. 386.09497; HPLC (isokratisch): 98.6% bei 254 nm und 97.4% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  50:50),  $t_r$  = 6.40 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 244 nm, 270 nm und 310 nm; HPLC (Gradient): 97.4% bei 254 nm (Methode C),  $t_r$  = 14.18 min,  $t_m$  = 1.25 min.

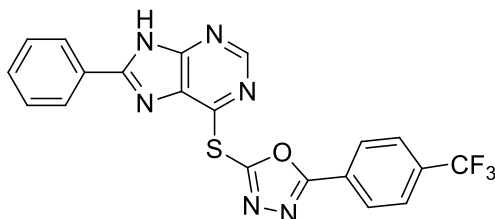
**2-(4-Methoxyphenyl)-5-[(8-phenyl-9H-purin-6-yl)thio]-1,3,4-oxadiazol (12t)**

Die Verbindung **12t** wurde nach AAV 4 synthetisiert. Dazu wurden 5-(4-Methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25e**, 161 mg, 0.773 mmol) und 6-Chlor-8-phenyl-9H-purin (**18a**, 140 mg, 0.607 mmol) unter Zusatz von DIPEA (117  $\mu$ L, 0.688 mmol) in DMF (2 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde aus Aceton umkristallisiert. Zur weiteren analytischen Aufreinigung erfolgte eine zusätzliche Umkristallisation aus Ethanol (96%)/Toluol.

Es wurden 99.0 mg eines gelblichen Feststoffes (41%) erhalten.

Schmp.: 250 – 251 °C (Zers.); IR (KBr): 3426  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.86 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.15 – 7.19 (m, 2H, ArH), 7.41 – 7.47 (m, 2H, ArH), 7.49 – 7.56 (m, 1H, ArH), 8.00 – 8.06 (m, 4H, ArH), 8.70 (s, 1H, ArH), 14.23 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 55.48 ( $\text{CH}_3$ ), 114.9, 126.9, 128.6, 128.9, 131.3, 151.4 (CH), 115.2, 128.1, 130.9, 152.8, 153.0, 153.2, 155.9, 162.4, 167.4 (C);  $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}$  (402.43); MS (EI):  $m/z$  (%) = 402 [ $\text{M}$ ] $^{+}$  (6), 360 [ $\text{M}^{+} - 42$ ] (3), 269 [ $\text{M} - \text{C}_8\text{H}_7\text{NO}$ ] $^{+}$  (100), 133 (66), HRMS (EI):  $m/z$  [ $\text{M}$ ] $^{+}$  ber. 402.08935, gef. 402.08896; HPLC (isokratisch): 98.6% bei 254 nm und 98.4% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  50:50),  $t_r$  = 4.51 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 199 nm, 288 nm und 307 nm; HPLC (Gradient): 98.7% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 13.4 min,  $t_m$  = 1.25 min.

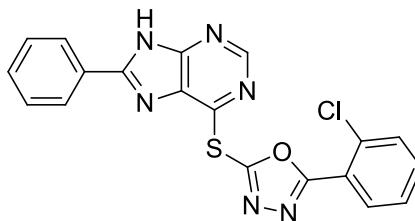
**2-[(8-Phenyl-9*H*-purin-6-yl)thio]-5-[4-(trifluormethyl)phenyl]-1,3,4-oxadiazol (12u)**



Die Verbindung **12u** wurde nach AAV 4 synthetisiert. Dazu wurden 5-(4-Trifluormethyl)phenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25b**, 194 mg, 0.788 mmol) und 6-Chlor-8-phenyl-9*H*-purin (**18a**, 94.6 mg, 0.410 mmol) unter Zusatz von DIPEA (136  $\mu$ L, 0.800 mmol) in DMF (2 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde aus Ethanol umkristallisiert.

Es wurden 88.5 mg eines gelblichen Feststoffes (49%) erhalten.

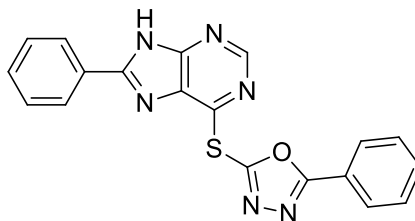
Schmp.: 257 – 258 °C (Zers.); IR (KBr): 3466  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 7.39 – 7.45 (m, 2H, ArH), 7.49 – 7.55 (m, 1H, ArH), 7.96 – 8.03 (m, 4H, ArH), 8.30 – 8.35 (m, 2H, ArH), 8.71 (s, 1H, ArH), 14.26 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 126.5 (m), 126.9, 127.7, 128.8, 131.4, 151.4 (CH), 123.5 (q,  $J$  = 272.6 Hz), 126.6, 128.1, 130.9, 132.1 (q,  $J$  = 32.41 Hz), 152.7, 152.9, 153.2, 157.7, 166.2 (C);  $\text{C}_{20}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_6\text{OS}$  (440.40); MS (EI):  $m/z$  (%) = 440  $[\text{M}]^{+}$  (9), 398  $[\text{M}^{+} - 42]$  (3), 269  $[\text{M} - \text{C}_8\text{H}_4\text{F}_3\text{N}]^{+}$  (100); HRMS (EI):  $m/z$   $[\text{M}]^{+}$  ber. 440.06617, gef. 440.06672; HPLC (isokratisch): 99.5% bei 254 nm und 99.5% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  60:40),  $t_r$  = 4.47 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 244 nm und 310 nm; HPLC (Gradient): 98.7% bei 254 nm (Methode B),  $t_r$  = 12.55 min,  $t_m$  = 1.25 min.

**2-(2-Chlorphenyl)-5-[(8-phenyl-9H-purin-6-yl)thio]-1,3,4-oxadiazol (12v)**

Die Verbindung **12v** wurde nach AAV 4 synthetisiert. Dazu wurden 5-(2-Chlorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25c**, 152 mg, 0.715 mmol) und 6-Chlor-8-phenyl-9H-purin (**18a**, 143 mg, 0.662 mmol) unter Zusatz von DIPEA (119  $\mu$ L, 0.700 mmol) in DMF (1.5 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde aus Toluol umkristallisiert. Zur analytischen Aufreinigung erfolgte eine weitere Umkristallisation aus Butan-1-ol.

Es wurden 156 mg eines gelblichen Feststoffes (62%) erhalten.

Schmp.: 238 – 239 °C (Zers.); IR (KBr): 3426  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 7.45 – 7.51 (m, 2H, ArH), 7.51 – 7.60 (m, 2H, ArH), 7.64 – 7.70 (m, 1H, ArH), 7.72 – 7.77 (m, 1H, ArH), 8.02 – 8.10 (m, 3H, ArH), 8.72 (s, 1H, ArH), 14.26 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  (ppm) = 126.9, 127.9, 128.8, 131.25, 131.33, 131.38, 133.7, 151.4 (CH), 121.8, 128.1, 131.0, 131.8, 152.5, 152.9, 153.3, 157.4, 165.5 (C);  $\text{C}_{19}\text{H}_{11}\text{ClN}_6\text{OS}$  (406.85); MS (EI):  $m/z$  (%) = 406  $[\text{M}]^{+*}$  (3), 269  $[\text{M} - \text{C}_7\text{H}_4\text{ClN}]^{+*}$  (100); HRMS (EI):  $m/z$   $[\text{M}]^{+*}$  ber. 406.03981, gef. 406.03953; HPLC (isokratisch): 98.4% bei 254 nm und 95.6% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  50:50),  $t_r$  = 5.67 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 228 nm, 280 nm und 386 nm; HPLC (Gradient): 98.2% bei 254 nm (Methode C),  $t_r$  = 13.38 min,  $t_m$  = 1.25 min.

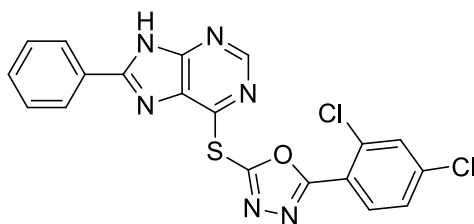
**2-Phenyl-5-[(8-phenyl-9*H*-purin-6-yl)thio]-1,3,4-oxadiazol (12w)**

Die Verbindung **12w** wurde nach AAV 4 synthetisiert. Dazu wurden 5-Phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25d**, 176 mg, 0.988 mmol) und 6-Chlor-8-phenyl-9*H*-purin (**18a**, 143 mg, 0.620 mmol) unter Zusatz von DIPEA (136  $\mu$ L, 0.800 mmol) in DMF (2 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde in Ethylacetat (300 mL) gelöst und mit einer mit DIPEA alkalisierten wässrigen Phase (3 x 150 mL) ausgeschüttelt. Die vereinten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck zur Trockne eingeeengt. Der erhaltene Feststoff wurde aus Toluol umkristallisiert.

Es wurden 40.9 mg eines gelblichen Feststoffes (18%) erhalten.

Schmp.: 234 – 235 °C; IR (KBr): 3428  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 7.39 – 7.45 (m, 2H, ArH), 7.48 – 7.54 (m, 1H, ArH), 7.60 – 7.66 (m, 2H, ArH), 7.66 – 7.72 (m, 1H, ArH), 7.98 – 8.03 (m, 2H, ArH), 8.08 – 8.13 (m, 2H, ArH), 8.70 (s, 1H, ArH), 14.24 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 126.7, 127.0, 128.8, 129.5, 131.3, 132.5, 151.4 (CH), 122.9, 128.1, 130.9, 152.8, 152.9, 153.2, 156.7, 167.4 (C);  $\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{N}_6\text{OS}$  (372.40); MS (EI):  $m/z$  (%) = 372 [ $\text{M}]^{+*}$  (8), 330 [ $\text{M}^{+*} - 42$ ] (3), 269 [ $\text{M} - \text{C}_7\text{H}_5\text{N}$ ] $^{+*}$  (100), 103 (44), 77 (44); HRMS (EI):  $m/z$  [ $\text{M}]^{+*}$  ber. 372.07878, gef. 372.07882; HPLC (isokratisch): 99.7% bei 254 nm und 99.4% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  50:50),  $t_r$  = 4.63 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 244 nm und 311 nm; HPLC (Gradient): 98.0% bei 254 nm (Methode C),  $t_r$  = 13.8 min,  $t_m$  = 1.25 min.

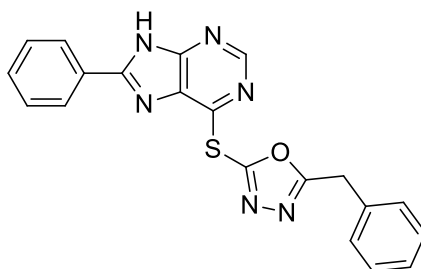


**2-(2,4-Dichlorphenyl)-5-[(8-phenyl-9H-purin-6-yl)thio]-1,3,4-oxadiazol (12x)**

Die Verbindung **12x** wurde nach AAV 4 synthetisiert. Dazu wurden 5-(2,4-Dichlorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25h**, 185 mg, 0.749 mmol) und 6-Chlor-8-phenyl-9H-purin (**18a**, 137 mg, 0.593 mmol) unter Zusatz von DIPEA (119  $\mu$ L, 0.700 mmol) in DMF (2 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde in Ethylacetat (100 mL) gelöst und mit einer mit DIPEA alkalisierten wässrigen Lösung (3 x 150 mL) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Der erhaltene Feststoff wurde aus Ethanol umkristallisiert.

Es wurden 25 mg eines gelblichen Feststoffes (10%) erhalten.

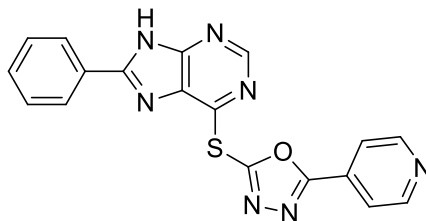
Schmp.: 255 – 256 °C (Zers.); IR (KBr): 3414  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 7.46 – 7.51 (m, 2H, ArH), 7.52 – 7.58 (m, 1H, ArH), 7.67 (dd,  $J$  = 2.10 Hz, 8.53 Hz, 1H, ArH), 7.97 (d,  $J$  = 2.08 Hz, 1H, ArH), 8.02 – 8.06 (m, 2H, ArH), 8.08 (d,  $J$  = 8.52 Hz, 1H, ArH), 8.72 (s, 1H, ArH), 14.26 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 127.0, 128.3, 128.9, 131.0, 131.4, 132.4, 151.4 (CH), 120.8, 128.1, 132.9, 137.6, 152.4, 152.9, 153.4, 157.6, 164.8 (C) (ein C nicht detektierbar);  $\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{OS}$  (441.29); MS (EI):  $m/z$  (%) = 440  $[\text{M}]^{++}$  (14), 398  $[\text{M}^{++} - 42]$  (6), 269  $[\text{M} - \text{C}_7\text{H}_3\text{Cl}_2\text{N}]^{++}$  (100); HRMS (ESI):  $m/z$   $[\text{M} + \text{Na}]^{++}$  ber. 462.99116, gef. 462.99088; HPLC (isokratisch): 99.3% bei 254 nm und 99.3% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  50:50),  $t_r$  = 7.91 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 244 nm, 263 nm und 310 nm; HPLC (Gradient): 97.7% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 15.27 min,  $t_m$  = 1.25 min.

**2-Benzyl-5-[(8-phenyl-9*H*-purin-6-yl)thio]-1,3,4-oxadiazol (12y)**

Die Verbindung **12y** wurde nach AAV 4 synthetisiert. Dazu wurden 5-Benzyl-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25i**, 76.1 mg, 0.396 mmol) und 6-Chlor-8-phenyl-9*H*-purin (**18a**, 48.0 mg, 0.208 mmol) unter Zusatz von DIPEA (68  $\mu$ L, 0.400 mmol) in DMF (2 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde aus Ethanol umkristallisiert.

Es wurden 23.0 mg eines farblosen Feststoffes (27%) erhalten.

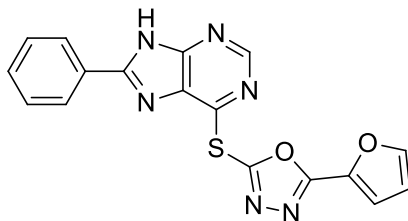
Schmp.: 199 – 200 °C (Zers.); IR (KBr): 3434  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 4.41 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.22 – 7.35 (m, 5H, ArH), 7.56 – 7.62 (m, 3H, ArH), 8.12 – 8.16 (m, 2H, ArH), 8.66 (s, 1H, ArH), 14.26 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 30.80 ( $\text{CH}_2$ ), 127.05, 127.11, 128.5, 128.7, 129.1, 131.4, 151.4 (CH), 128.2, 131.1, 133.9, 152.2, 152.6, 153.4, 156.8, 169.2 (C);  $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{OS}$  (386.43); MS (EI):  $m/z$  (%) = 386  $[\text{M}]^{+}$  (18), 344  $[\text{M}^{+} - 42]$  (5), 269  $[\text{M} - \text{C}_8\text{H}_7\text{N}]^{+}$  (100), 91 (57); HRMS (EI):  $m/z$   $[\text{M}]^{+}$  ber. 386.09443, gef. 386.09466; HPLC (isokratisch): 99.6% bei 254 nm und 99.0% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  50:50),  $t_r$  = 4.02 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 240 nm und 310 nm; HPLC (Gradient): 98.2% bei 254 nm (Methode B),  $t_r$  = 10.55 min,  $t_m$  = 1.25 min.

**2-[(8-Phenyl-9*H*-purin-6-yl)thio]-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol (12z)**

Die Verbindung **12z** wurde nach AAV 3 synthetisiert. Dazu wurden 5-(Pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25k**, 63.9 mg, 0.357 mmol) und 6-Chlor-8-phenyl-9*H*-purin (**18a**, 81.1 mg, 0.352 mmol) unter Zusatz von DIPEA (59.5  $\mu$ L, 0.350 mmol) in Butan-1-ol (10 mL) gegeben und für 4 h zum Rückfluss erhitzt. Der erhaltene Feststoff wurde aus Butan-1-ol umkristallisiert.

Es wurden 53.8 mg eines farblosen Feststoffes (41%) erhalten.

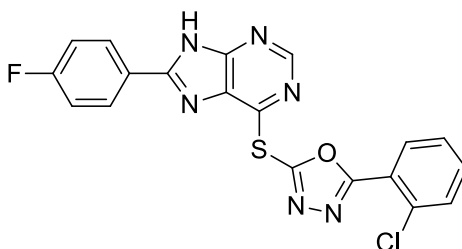
Schmp.: 251 – 252 °C (Zers.); IR (KBr): 3434  $\text{cm}^{-1}$  (NH),  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 7.40 – 7.46 (m, 2H, ArH), 7.50 – 7.54 (m, 1H, ArH), 7.95 – 8.00 (m, 2H, ArH), 8.02 – 8.07 (m, 2H, ArH), 8.71 (s, 1H, ArH), 8.84 – 8.89 (m, 2H, ArH), 14.26 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 120.2, 126.8, 128.8, 131.4, 151.1, 151.4 (CH), 128.0, 129.9, 130.8, 152.6, 153.0, 153.2, 158.2, 165.8 (C);  $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{N}_7\text{OS}$  (373.39); MS (EI):  $m/z$  (%) = 373 [ $\text{M}]^{+}$ ] (10), 331 [ $\text{M}^{+} - 42$ ] (3), 269 [ $\text{M} - \text{C}_5\text{H}_4\text{N}_2$ ] $^{+}$  (100); HRMS (EI):  $m/z$  [ $\text{M}]^{+}$ ] ber. 373.07403, gef. 373.07403; HPLC (isokratisch): 99.4% bei 254 nm und 97.9% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  40:60),  $t_r$  = 3.8 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 242 nm und 310 nm; HPLC (Gradient): 99.4% bei 254 nm (Methode B),  $t_r$  = 9.05 min,  $t_m$  = 1.25 min.

**2-(Furan-2-yl)-5-[(8-phenyl-9*H*-purin-6-yl)thio]-1,3,4-oxadiazol (12aa)**

Die Verbindung **12aa** wurde nach AAV 4 synthetisiert. Dazu wurden 5-(Furan-2-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25j**, 140 mg, 0.832 mmol) und 6-Chlor-8-phenyl-9*H*-purin (**18a**, 92.5 mg, 0.401 mmol) unter Zusatz von DIPEA (136  $\mu$ L, 0.800 mmol) in DMF (1 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde aus Methanol umkristallisiert.

Es wurden 58.2 mg eines gelblichen Feststoffes (40%) erhalten.

Schmp.: 225 – 226 °C (Zers.); IR (KBr): 3426  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 6.82 – 6.86 (m, 1H, ArH), 7.45 – 7.57 (m, 4H, ArH), 8.01 – 8.06 (m, 2H, ArH), 8.12 – 8.16 (m, 1H, ArH), 8.70 (s, 1H, ArH), 14.26 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 112.8, 115.7, 126.9, 128.9, 131.5, 147.6, 151.4 (CH), 128.1, 130.8, 138.2, 152.8, 153.2, 156.0, 160.1 (C) (ein C nicht detektierbar);  $\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}$  (362.37); MS (EI):  $m/z$  (%) = 362 [ $\text{M}]^{++}$  (7), 320 [ $\text{M}^{++} - 42$ ] (2), 269 [ $\text{M} - \text{C}_5\text{H}_3\text{NO}]^{++}$  (100); HRMS (EI):  $m/z$  [ $\text{M}]^{++}$  ber. 362.05805, gef. 362.05899; HPLC (isokratisch): 98.5% bei 254 nm und 98.9% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  40:60),  $t_r$  = 5.71 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 241 nm, 284 nm und 309 nm; HPLC (Gradient): 98.4% bei 254 nm (Methode B),  $t_r$  = 9.70 min,  $t_m$  = 1.25 min.

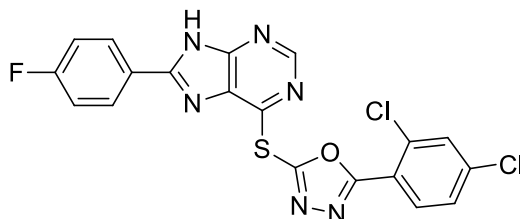
**(2-Chlorphenyl)-5-[[8-(4-fluorphenyl)-9H-purin-6-yl]thio]-1,3,4-oxadiazol (12ab)**

Die Verbindung **12ab** wurde nach AAV 3 synthetisiert. Dazu wurden 6-Chlor-8-(4-fluorphenyl)-9H-purin (**18c**, 145 mg, 0.584 mmol) und 5-(2-Chlorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25c**, 142 mg, 0.668 mmol) unter Zusatz von Triethylamin (91  $\mu$ L, 0.656 mmol) in Propan-2-ol (10 mL) suspendiert und für 15 h zum Rückfluss erhitzt. Der erhaltene Feststoff wurde aus Toluol/Ethanol umkristallisiert.

Es wurden 156 mg eines gelblichen Feststoffes (63%) erhalten.

Schmp.: 243 – 244 °C (Zers.); IR (KBr): 3434  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400.4 MHz):  $\delta$  (ppm) = 7.31 – 7.41 (m, 2H, ArH), 7.54 – 7.63 (m, 1H, ArH), 7.63 – 7.72 (m, 1H, ArH), 7.71 – 7.79 (m, 1H, ArH), 8.04 – 8.09 (m, 1H, ArH), 8.08 – 8.16 (m, 2H, ArH), 8.72 (s, 1H, ArH), 14.27 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 100.7 MHz):  $\delta$  (ppm) = 116.2 (d,  $J = 22.29$  Hz), 128.0, 129.6 (d,  $J = 8.96$  Hz), 131.35, 131.39, 133.8, 151.5 (CH), 121.9, 124.9 (d,  $J = 2.87$  Hz), 131.1, 131.9, 152.6, 153.0, 157.5, 163.9 (d,  $J = 249.81$  Hz), 165.6 (C) (ein C nicht detektierbar);  $\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{ClFN}_6\text{OS}$  (424.84); ber. C 53.72, H 2.37, N 19.78, gef. C 54.10, H 2.51, N 19.56; MS (EI):  $m/z$  (%) = 424  $[\text{M}]^{+*}$  (3), 389  $[\text{M}^{+*} - 42]$  (3), 287  $[\text{M} - \text{C}_7\text{H}_4\text{ClN}]^{+*}$  (100); HPLC (isokratisch): 98.9% bei 254 nm und 98.5% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  50:50),  $t_r = 6.38$  min,  $t_m = 1.05$  min,  $\lambda_{\text{max}} = 243$  nm und 310 nm; HPLC (Gradient): 99.4% bei 254 nm (Methode A),  $t_r = 11.97$  min,  $t_m = 1.25$  min.

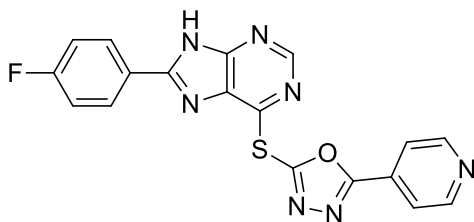
**2-(2,4-Dichlorphenyl)-5-{[8-(4-fluorphenyl)-9*H*-purin-6-yl]thio}-1,3,4-oxadiazol (12ac)**



Die Verbindung **12ac** wurde nach AAV 5 hergestellt. Dazu wurden 6-Chlor-8-(4-fluorphenyl)-9*H*-purin (**18c**, 174 mg, 0.700 mmol) und 5-(2,4-Dichlorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25h**, 185 mg, 0.749 mmol) unter Zusatz von Triethylamin (104  $\mu$ L, 0.750 mmol) in DMF (3 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde aus Toluol/Ethanol umkristallisiert.

Es wurden 172 mg eines farblosen Feststoffes (53%) erhalten.

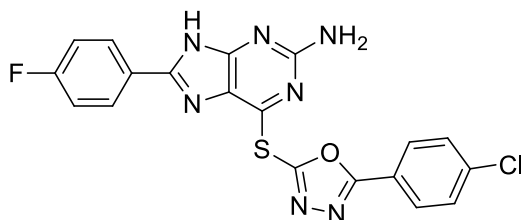
Schmp.: 258 – 259 °C (Zers.); IR (KBr): 3282  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 7.34 – 7.41 (m, 2H, ArH), 7.67 (dd,  $J$  = 8.51 Hz, 2.09 Hz, 1H, ArH), 7.97 (d,  $J$  = 2.11 Hz, 1H, ArH), 8.07 (d,  $J$  = 8.50 Hz, 1H, ArH), 8.09 – 8.13 (m, 2H, ArH), 8.71 (s, 1H, ArH), 14.28 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 116.3 (d,  $J$  = 22.10 Hz), 128.4, 129.6 (d,  $J$  = 8.60 Hz), 131.1, 132.5, 151.5 (CH), 120.9, 124.9 (d,  $J$  = 2.98 Hz), 133.0, 137.8, 152.4, 152.6, 153.0, 157.7, 163.9 (d,  $J$  = 250.0 Hz), 164.9 (C) (ein C nicht detektierbar);  $\text{C}_{19}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{FN}_6\text{OS}$  (459.28); MS (EI):  $m/z$  (%) = 458  $[\text{M}]^{+}$  (16), 287  $[\text{M} - \text{C}_7\text{H}_3\text{Cl}_2\text{N}]^{+}$  (100); HRMS (EI):  $m/z$   $[\text{M}]^{+}$  ber. 457.99141, gef. 457.99171; HPLC (isokratisch): 99.2% bei 254 nm und 98.8% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  55:45),  $t_r$  = 5.32 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 243 nm und 311 nm; HPLC (Gradient): 97.6% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 13.0 min,  $t_m$  = 1.25 min.

**2-([8-(4-Fluorphenyl)-9H-purin-6-yl]thio)-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol (12ad)**

Die Verbindung **12ad** wurde nach AAV 3 synthetisiert. Dazu wurden 6-Chlor-8-(4-fluorphenyl)-9H-purin (**18c**, 126 mg, 0.506 mmol) und 5-(Pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25k**, 109 mg, 0.607 mmol) unter Zusatz von Triethylamin (90  $\mu$ L, 0.649 mmol) in Propan-2-ol (10 mL) suspendiert. Der Ansatz wurde für 15 h zum Rückfluss erhitzt. Der erhaltene Feststoff wurde aus Toluol/Ethanol umkristallisiert. Zur analytischen Aufreinigung erfolgte eine zweite Umkristallisation aus Toluol/Ethanol.

Es wurden 128 mg eines gelblichen Feststoffes (65%) erhalten.

Schmp.: 228 – 229 °C (Zers.); IR (KBr): 3431  $\text{cm}^{-1}$  (NH);  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 400.4 MHz):  $\delta$  (ppm) = 7.27 – 7.37 (m, 2H, ArH), 8.00 – 8.09 (m, 4H, ArH), 8.71 (s, 1H, ArH), 8.83 – 8.90 (m, 2H, ArH), 14.27 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 100.7 MHz):  $\delta$  (ppm) = 116.2 (d,  $J$  = 22.26 Hz), 120.3, 129.4 (d,  $J$  = 8.77 Hz), 151.2, 151.5 (CH), 124.8 (d,  $J$  = 2.89 Hz), 129.9, 131.0, 152.5, 152.6, 153.0, 158.2, 163.9 (d,  $J$  = 250.1 Hz), 165.9 (C);  $\text{C}_{18}\text{H}_{10}\text{FN}_7\text{OS}$  (391.38); MS (EI):  $m/z$  (%) = 391  $[\text{M}]^{++}$  (10), 349  $[\text{M}^{++} - 42]$ , 287  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_4\text{N}_2]^{++}$  (100); HRMS (ESI):  $m/z$   $[\text{M} + \text{Na}]^{++}$  ber. 414.05463, gef. 414.05438; HPLC (isokratisch): 99.5% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  45:55),  $t_r$  = 3.33 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 242 nm und 309 nm; HPLC (Gradient): 99.5% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 10.08 min,  $t_m$  = 1.25 min.

**6-([5-(4-Chlorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]thio)-8-(4-fluorphenyl)-9H-purin-2-amin (13a)**

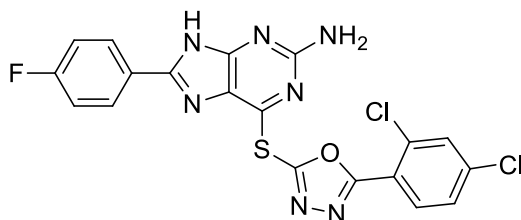
Verbindung **13a** wurde nach AAV 5 synthetisiert. Dazu wurden 6-Chlor-8-(4-fluorphenyl)-9H-purin-2-amin (**23**, 121 mg, 0.459 mmol) und 5-(4-Chlorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25a**, 128 mg, 0.602 mmol) unter Zusatz von Triethylamin (83  $\mu$ L, 0.699 mmol) in DMF (3 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde aus Toluol/Ethanol umkristallisiert.

Es wurden 88.5 mg eines farblosen Feststoffes (44%) erhalten.

Schmp.: 256 – 257 °C (Zers.); IR (KBr): 3457, 3345  $\text{cm}^{-1}$  (NH,  $\text{NH}_2$ );  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 6.70 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.16 – 7.28 (m, 2H, ArH), 7.67 – 7.72 (m, 2H, ArH), 7.82 – 7.89 (m, 2H, ArH), 8.07 – 8.12 (m, 2H, ArH), 13.21 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 115.8 (d,  $J$  = 21.94 Hz), 128.4 (d,  $J$  = 8.75 Hz), 128.6, 129.8 (CH), 122.1, 124.0, 125.6 (d,  $J$  = 8.75 Hz), 137.0, 148.3, 153.5, 155.4, 157.4, 159.5, 163.1 (d,  $J$  = 248.6 Hz), 166.5 (C);  $\text{C}_{19}\text{H}_{11}\text{ClFN}_7\text{OS}$  (439.85); MS (EI):  $m/z$  (%) = 439 [ $\text{M}]^{++}$  (63), 431 [ $\text{M}^{++} - 42$ ] (4), 302 [ $\text{M} - \text{C}_7\text{H}_4\text{ClN}$ ] $^{++}$  (100), 228 (55); HRMS (EI):  $m/z$  [ $\text{M}]^{++}$  ber. 439.04129, gef. 439.04157; HPLC (isokratisch): 99.3% bei 254 nm und 99.5% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  50:50),  $t_r$  = 6.65 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 254 nm und 342 nm; HPLC (Gradient): 97.8% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 12.12 min,  $t_m$  = 1.25 min.



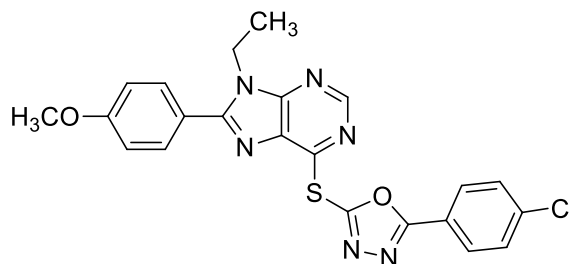
## 6-([5-(2,4-Dichlorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]thio)-8-(4-fluorphenyl)-9H-purin-2-amin (**13b**)



Die Verbindung **13b** wurde nach AAV 5 synthetisiert. Dazu wurden 6-Chlor-8-(4-fluorphenyl)-9H-purin-2-amin (**23**, 94.4 mg, 0.358 mmol) und 5-(2,4-Dichlorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25h**, 104 mg, 0.419 mmol) unter Zusatz von Triethylamin (30  $\mu$ L, 0.216 mmol) in DMF (3 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde aus Toluol/Ethanol umkristallisiert.

Es wurden 61.6 mg eines farblosen Feststoffes (36%) erhalten.

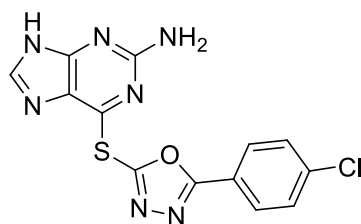
Schmp.: 253 – 254 °C (Zers.); IR (KBr): 3454, 3335  $\text{cm}^{-1}$  (NH,  $\text{NH}_2$ );  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 6.72 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.22 – 7.30 (m, 2H, ArH), 7.66 (dd,  $J$  = 2.11 Hz, 8.54 Hz, 1H, ArH), 7.87 – 7.93 (d,  $J$  = 2.08 Hz, 1H, ArH), 8.06 (d,  $J$  = 8.57 Hz, 1H, ArH), 13.2 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 115.9 (d,  $J$  = 21.98 Hz), 128.3, 128.4 (d,  $J$  = 8.55 Hz), 131.0, 132.5 (CH), 121.0, 124.2, 125.6 (d,  $J$  = 2.89 Hz), 133.0, 137.6, 148.4, 153.1, 155.4, 158.0, 159.4, 163.2 (d,  $J$  = 248.5 Hz), 164.7 (C);  $\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{FN}_7\text{OS}$  (474.30); ber. C 48.11, H 2.13, N 20.67, gef. C 48.41, H 2.10, N 20.37; MS (EI):  $m/z$  (%) = 473 [ $\text{M}]^{+}$  (62), 431 [ $\text{M}^{+} - 42$ ] (7), 302 [ $\text{M} - \text{C}_7\text{H}_3\text{Cl}_2\text{N}$ ] $^{+}$  (100), 228 (71); HPLC (isokratisch): 99.4% bei 254 nm und 99.6% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  60:40),  $t_r$  = 4.29 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 251 nm und 343 nm; HPLC (Gradient): 97.8% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 12.59 min,  $t_m$  = 1.25 min.

**2-(4-Chlorphenyl)-5-[[9-ethyl-8-(4-methoxyphenyl)-9H-purin-6-yl]thio]-1,3,4-oxadiazol (14)**

Die Verbindung **14** wurde nach AVV 5 synthetisiert. Dazu wurden 6-Chlor-9-ethyl-8-(4-methoxyphenyl)-9H-purin (**19**, 145 mg, 0.502 mmol) und 5-(4-Chlorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25a**, 119 mg, 0.600 mmol) unter Zusatz von Triethylamin (83  $\mu$ L, 0.600 mmol) in DMF (3 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde aus Ethanol umkristallisiert.

Es wurden 107 mg eines gelblichen Feststoffes (46%) erhalten.

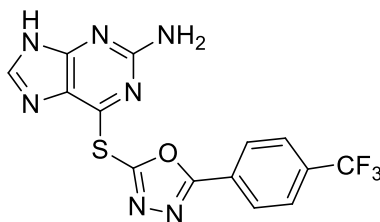
Schmp.: 220 – 223 °C (Zers.); IR (KBr): 3434  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromatisch);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1.33 (t,  $J$  = 7.19 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.84 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4.37 (q,  $J$  = 6.87 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6.94 – 7.04 (m, 2H, ArH), 7.60 – 7.66 (m, 2H, ArH), 7.69 – 7.75 (m, 2H, ArH), 8.04 – 8.13 (m, 2H, ArH), 8.74 (s, 1H, ArH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 14.47, 55.40 ( $\text{CH}_3$ ), 40.04 ( $\text{CH}_2$ ), 114.3, 128.7, 129.8, 130.6, 151.1 (CH), 120.7, 121.9, 120.1, 137.4, 151.1, 152.9, 154.5, 157.1, 161.2, 166.7 (C);  $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{ClN}_6\text{O}_2\text{S}$  (464.93); ber. C 56.83, H 3.69, N 18.08, gef. C 56.82, H 3.42, N 18.11; MS (EI):  $m/z$  (%) = 464 [ $\text{M}]^{++}$  (13), 422 [ $\text{M}^{++} - 42$ ] (3), 327 [ $\text{M} - \text{C}_7\text{H}_4\text{ClN}]^{++}$  (100); HPLC (isokratisch): 97.2% bei 254 nm und 95.6% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  65:35),  $t_r$  = 5.91 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 260 nm und 306 nm; HPLC (Gradient): 97.4% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 14.29 min,  $t_m$  = 1.25 min.

**6-([5-(4-Chlorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]thio)-9H-purin-2-amin (15a)**

Die Verbindung **15a** wurde nach AAV 5 synthetisiert. Dazu wurden 6-Chlor-9H-purin-2-amin (119 mg, 0.702 mmol) und 5-(4-Chlorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25a**, 161 mg, 0.757 mmol) unter Zusatz von Triethylamin (104  $\mu$ L, 0.750 mmol) in DMF (3 mL) gegeben. Der Reaktionsansatz wurde auf Wasser (20 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde abgesaugt.

Es wurden 180 mg eines gelblichen Feststoffes (74%) erhalten.

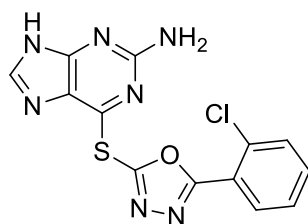
Schmp.: 218 – 219 °C (Zers.); IR (KBr): 3506, 3289  $\text{cm}^{-1}$  (NH,  $\text{NH}_2$ );  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 6.58 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.66 – 7.74 (m, 2H, ArH), 7.95 (s, 1H, ArH), 8.01 – 8.07 (m, 2H, ArH), 12.76 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 128.6, 129.7, 140.9 (CH), 122.0, 123.4, 137.2, 153.4, 153.6, 157.5, 159.6, 166.4;  $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{ClN}_7\text{OS}$  (345.77); ber. C 45.16, H 2.33, N 28.36, gef. C 45.21, H 1.97, N 27.99; MS (EI):  $m/z$  (%) = 345 [ $\text{M}]^{++}$  (16), 303 [ $\text{M}^{++} - 42$ ] (2), 208 [ $\text{M} - \text{C}_7\text{H}_4\text{ClN}]^{++}$  (100); HPLC (isokratisch): 95.7% bei 254 nm und 95.9% bei 280 nm ( $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$  35:65),  $t_r$  = 4.51 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 266 nm und 314 nm; HPLC (Gradient): 97.9% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 9.35 min,  $t_m$  = 1.25 min.

**6-({5-[4-(Trifluormethyl)phenyl]-1,3,4-oxadiazol-2-yl}thio)-9*H*-purin-2-amin (**15b**)**

Die Verbindung **15b** wurde nach AAV 5 synthetisiert. Dazu wurden 6-Chlor-9*H*-purin-2-amin (187 mg, 1.10 mmol) und 5-[4-(Trifluormethyl)phenyl]-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25b**, 308 mg, 1.25 mmol) unter Zusatz von Triethylamin (173  $\mu$ L, 1.25 mmol) in DMF (3 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde aus Ethanol umkristallisiert.

Es wurden 254 mg eines gelblichen Feststoffes (61%) erhalten.

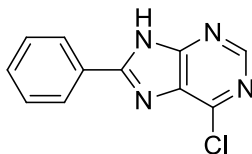
Schmp.: 228 – 229 °C (Zers.); IR (KBr): 3442, 3323  $\text{cm}^{-1}$  (NH,  $\text{NH}_2$ );  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 6.60 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.95 (s, 1H, ArH), 7.97 – 8.02 (m, 2H, ArH), 8.22 – 8.27 (m, 2H, ArH), 12.77 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 126.5 (q,  $J = 3.84$  Hz), 127.7, 140.9 (CH), 123.7 (q,  $J = 272.6$  Hz), 123.4, 126.9, 131.9 (q,  $J = 32.18$  Hz), 153.4, 153.6, 158.1, 159.6, 166.1 (C);  $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{F}_3\text{N}_7\text{OS}$  (379.32); MS (EI):  $m/z$  (%) = 379 [ $\text{M}]^{+}$  (32); 337 [ $\text{M}^{+} - 42$ ] (5), 208 [ $\text{M} - \text{C}_8\text{H}_4\text{F}_3\text{N}]^{+}$  (100), 145 (66), 134 (52); HRMS (EI):  $m/z$  [ $\text{M}]^{+}$  ber. 379.04576, gef. 379.04520; HPLC (isokratisch): 97.4% bei 254 nm und 97.8% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  40:60),  $t_r = 4.27$  min,  $t_m = 1.05$  min,  $\lambda_{\text{max}} = 226$  nm, 247 nm und 315 nm; HPLC (Gradient): 99.4% bei 254 nm (Methode A),  $t_r = 9.84$  min,  $t_m = 1.25$  min.

**6-([5-(2-Chlorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]thio)-9*H*-purin-2-amin (**15c**)**

Die Verbindung **15c** wurde nach AAV 5 synthetisiert. Dazu wurden 6-Chlor-9*H*-purin-2-amin (137 mg, 0.808 mmol) und 5-(2-Chlorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25c**, 183 mg, 0.861 mmol) unter Zusatz von Triethylamin (119  $\mu$ L, 0.858 mmol) in DMF (3 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde aus Ethanol umkristallisiert.

Es wurden 186 mg eines farblosen Feststoffes (67%) erhalten.

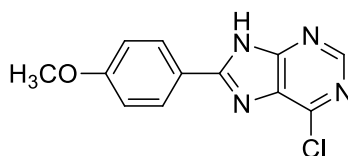
Schmp.: 230 – 231 °C (Zers.); IR (KBr): 3422  $\text{cm}^{-1}$ , 3304  $\text{cm}^{-1}$  (NH,  $\text{NH}_2$ );  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 6.59 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.55 – 7.61 (m, 1H, ArH), 7.64 – 7.71 (m, 1H, ArH), 7.73 (dd,  $J$  = 8.14 Hz, 1.20 Hz, 1H, ArH), 7.97 (s, 1H, ArH), 7.99 (dd,  $J$  = 7.75, 1.68 Hz, 1H, ArH), 12.77 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 128.0, 131.3, 131.4, 133.6, 140.9 (CH), 122.3, 123.5, 131.9, 153.3, 153.7, 159.6, 159.6, 165.4 (C);  $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{ClN}_7\text{OS}$  (345.77); ber. C 45.16, H 2.33, N 28.36, gef. C 45.32, H 2.20, N 28.11; MS (EI):  $m/z$  (%) = 345  $[\text{M}]^{+}$  (15), 208  $[\text{M} - \text{C}_7\text{H}_4\text{ClN}]^{+}$  (100), 137 (44); HPLC (isokratisch): 98.4% bei 254 nm und 98.1% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  30:70),  $t_r$  = 4.73 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 247 nm und 316 nm; HPLC (Gradient): 95.7% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 8.82 min,  $t_m$  = 1.25 min.

**6-Chlor-8-phenyl-9H-purin (18a)**

Die Verbindung **18a** wurde nach AAV 1 synthetisiert. Dazu wurden 6-Chlorpyrimidin-4,5-diamin (405 mg, 2.80 mmol) und Ammoniumchlorid (905 mg, 16.9 mmol) in POCl<sub>3</sub> (20 mL) suspendiert. Nach Zusatz von Benzoylchlorid (1613 µL, 14.0 mmol) wurde für 24 h auf 100 °C erhitzt. Der erhaltene Feststoff wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel aufgereinigt (Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 2:5).

Es wurden 129 mg eines farblosen Feststoffes erhalten (20%).

Schmp.: 255 – 256 °C (Zers.) (Lit.: >260 °C)<sup>106</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 399.9 MHz): δ (ppm) = 7.56 – 7.69 (m, 3H, ArH), 8.20 – 8.38 (m, 2H, ArH), 8.73 (s, 1H, ArH), 14.35 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100.5 MHz): δ (ppm) = 127.3, 128.4, 131.6, 151.4 (CH), 129.2 (C) (4 C nicht detektierbar, entspricht den Literaturangaben); C<sub>11</sub>H<sub>7</sub>ClN<sub>4</sub> (230.65).

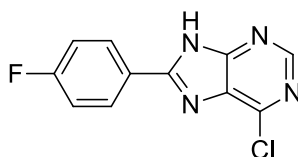
**6-Chlor-8-(4-methoxyphenyl)-9H-purin (18b)**

Die Verbindung **18b** wurde nach AAV 1 synthetisiert. Dazu wurden 6-Chlorpyrimidin-4,5-diamin (403 mg, 2.79 mmol) und Ammoniumchlorid (889 mg, 16.8 mmol) in POCl<sub>3</sub> (20 mL) suspendiert. Nach Zusatz von 4-Methoxybenzoylchlorid (382 µL, 2.82 mmol) wurde für 15 h auf 100 °C erhitzt. Der erhaltene Feststoff wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel aufgereinigt (Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 3:1).

Es wurden 429 mg eines farblosen Feststoffes erhalten (59%).

Schmp.: 241 – 243 °C (Zers.) (Lit.: 242 – 244 °C)<sup>164</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600.1 MHz): δ (ppm) = 3.87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.13 – 7.19 (m, 2H, ArH), 8.21 – 8.26 (m, 2H, ArH), 8.69 (s, 1H, ArH), 14.17 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 150.9 MHz): δ (ppm) = 55.51 (CH<sub>3</sub>), 114.6, 129.2 151.0 (CH), 120.7, 131.8, 146.9, 154.5, 162.0 (C) (1 C nicht detektierbar); C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>ClN<sub>4</sub>O (260.68).

### 6-Chlor-8-(4-fluorphenyl)-9*H*-purin (18c)

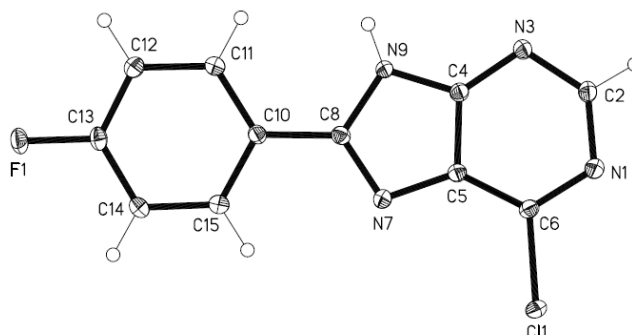


Die Verbindung **18c** wurde nach AAV 1 synthetisiert. Dazu wurden 6-Chlorpyrimidin-4,5-diamin (403 mg, 2.79 mmol) und Ammoniumchlorid (889 mg, 16.8 mmol) in POCl<sub>3</sub> (20 mL) suspendiert. Nach Zusatz von 4-Fluorbenzoylchlorid (340 µL, 2.84 mmol) wurde für 15 h bei 100 °C erhitzt. Der erhaltene Feststoff wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel aufgereinigt (Fließmittel: PE/EA 1:1). Zur analytischen Aufreinigung erfolgte eine zusätzliche Umkristallisation aus Aceton.

Es wurden 286 mg eines gelblichen Feststoffes erhalten (41%).

Schmp.: 240 – 241 °C; IR (KBr): 3433 m<sup>-1</sup>(NH); <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600.1 MHz): δ (ppm) = 7.44 – 7.51 (m, 2H, ArH), 8.30 – 8.36 (m, 2H, ArH), 8.73 (s, 1H, ArH), 14.35 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 150.9 MHz): δ (ppm) = 116.4 (*d*, *J* = 22.16 Hz), 129.9 (*d*, *J* = 7.44 Hz), 151.5 (CH), 125.0 (*d*, *J* = 2.95 Hz), 131.6, 147.5, 153.7, 154.4, 164.1 (*d*, *J* = 250.01 Hz); C<sub>11</sub>H<sub>6</sub>ClFN<sub>4</sub> (248.65); ber. C 53.14, H 2.43, N 22.53; gef. C 52.93 H 2.29, N 22.19; MS (EI): *m/z* (%) = [M]<sup>++</sup> 248 (100), 213 (50); HPLC (isokratisch): 99.9% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm (ACN/H<sub>2</sub>O 30:70), *t<sub>r</sub>* = 5.36 min, *t<sub>m</sub>* = 1.05 min, λ<sub>max</sub> = 235 nm, 299 nm und 308 nm; HPLC (Gradient): 99.4% bei 254 nm (Methode A), *t<sub>r</sub>* = 8.83 min, *t<sub>m</sub>* = 1.25 min.

Die Röntgenkristallstruktur der Verbindung **18c** wurde von Herrn Prof. Dr. Peter G. Jones angefertigt. Die Kristalle wurden durch Umkristallisation aus Aceton gewonnen.



**Abbildung 8-1:** Röntgenkristallstruktur der Verbindung **18c**; Die Nummerierung entspricht nicht der Anordnung von Lokanten gemäß IUPAC-Nomenklatur.

**Tabelle 8-1:** Kristalldaten und Strukturverfeinerung

Summenformel	$\text{C}_{11}\text{H}_6\text{ClFN}_4$
$M_r$	248.65
Temperatur	100(2) K
Wellenlänge	0.71073 Å
Kristallsystem	Monoclin
Raumgruppe	$P2_1/n$
Gitterkonstanten	$a = 5.5664(3)$ Å $\alpha = 90^\circ$
	$b = 20.7224(7)$ Å $\beta = 95.108(4)^\circ$
	$c = 8.5043(3)$ Å $\gamma = 90^\circ$
Volumen	$977.06(7)$ Å <sup>3</sup>
Z	4
Dichte (berechnet)	$1.690 \text{ Mg/m}^3$
Absorptionskoeffizient	$0.384 \text{ mm}^{-1}$
$F(000)$	504
Kristallgröße	$0.45 \times 0.20 \times 0.20 \text{ mm}^3$
$\Theta$ -Bereich für die Datensammlung	2.60 to $30.97^\circ$
Limitierende Indices	$-7 \leq h \leq 7$ , $-28 \leq k \leq 29$ , $-12 \leq l \leq 11$
Zahl der Reflexe	30836
Unabhängige Reflexe	2926 [ $R(\text{int}) = 0.0300$ ]
Vollständigkeit bis $\Theta = 30.00^\circ$	98.6%



Absorptionskorrektur	Semi-empirical from equivalents
Max. und min. Transmission	1.00000 and 0.93399
Verfeinerungsmethode	Full-matrix least-squares on $F^2$
Daten/Einschränkungen/Parameter	2926 / 0 / 158
Goodness-of-fit on $F^2$	1.061
Final R indices [ $I > 2\sigma(I)$ ]	$R1 = 0.0310$ , $wR2 = 0.0791$
R indices (alle Daten)	$R1 = 0.0347$ , $wR2 = 0.0814$
Größte Differenzpeaks	0.479 und -0.210 e.Å <sup>-3</sup>

Tabelle 8-2: Atomkoordinaten ( $\times 10^4$ ) und äquivalente isotropische Verschiebungsparameter (Å<sup>2</sup>  $\times 10^3$ ). U(eq) ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten  $U_{ij}$ -Tensors.<sup>a</sup>

	x	y	z	U(eq)
N(1)	6548.3(18)	6867.2(5)	4994.3(11)	13.5(2)
C(2)	8434(2)	6517.1(5)	5605.2(13)	13.9(2)
N(3)	8956.9(17)	5899.6(5)	5293.3(11)	12.7(2)
C(4)	7306.5(19)	5630.4(5)	4256.6(12)	11.2(2)
C(5)	5214.4(19)	5934.3(5)	3564.0(12)	11.2(2)
C(6)	4952(2)	6576.5(5)	3975.1(12)	11.8(2)
N(7)	3902.9(17)	5522.1(4)	2547.9(11)	12.0(2)
C(8)	5189.0(19)	4984.4(5)	2613.2(12)	11.1(2)
N(9)	7265.3(17)	5021.6(5)	3638.1(11)	11.4(2)
C(10)	4539.2(19)	4410.1(5)	1671.3(12)	11.1(2)
C(11)	6099(2)	3886.4(5)	1598.8(13)	13.3(2)
C(12)	5459(2)	3358.9(5)	639.5(13)	14.2(2)
C(13)	3246(2)	3373.2(5)	-237.9(13)	12.7(2)
C(14)	1632(2)	3880.3(6)	-189.3(13)	14.1(2)
C(15)	2299(2)	4399.7(5)	783.0(13)	14.0(2)
F(1)	2631.2(13)	2870.7(3)	-1206.2(8)	16.6(2)
Cl(1)	2580.1(5)	7021.8(1)	3115.8(3)	14.9(1)

<sup>a</sup> Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 8-3: Bindungslängen [Å]<sup>a</sup>

N(1)-C(6)	1.3290(14)	C(8)-N(9)	1.3864(14)
N(1)-C(2)	1.3419(15)	C(8)-C(10)	1.4619(15)
C(2)-N(3)	1.3440(14)	C(10)-C(11)	1.3948(15)
N(3)-C(4)	1.3372(14)	C(10)-C(15)	1.3994(15)
C(4)-N(9)	1.3662(14)	C(11)-C(12)	1.3913(15)
C(4)-C(5)	1.4063(15)	C(12)-C(13)	1.3823(16)
C(5)-N(7)	1.3773(14)	C(13)-F(1)	1.3525(12)
C(5)-C(6)	1.3868(15)	C(13)-C(14)	1.3856(16)
C(6)-Cl(1)	1.7197(11)	C(14)-C(15)	1.3877(15)
N(7)-C(8)	1.3230(14)		

<sup>a</sup> Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 8-4: Bindungswinkel [°]<sup>a</sup>

C(6)-N(1)-C(2)	117.50(10)	N(7)-C(8)-C(10)	123.79(10)
N(1)-C(2)-N(3)	127.89(11)	N(9)-C(8)-C(10)	122.79(9)
C(4)-N(3)-C(2)	112.27(10)	C(4)-N(9)-C(8)	106.14(9)
N(3)-C(4)-N(9)	128.75(10)	C(11)-C(10)-C(15)	119.51(10)
N(3)-C(4)-C(5)	125.73(10)	C(11)-C(10)-C(8)	122.21(10)
N(9)-C(4)-C(5)	105.51(9)	C(15)-C(10)-C(8)	118.25(10)
N(7)-C(5)-C(6)	133.75(10)	C(12)-C(11)-C(10)	120.61(10)
N(7)-C(5)-C(4)	110.97(9)	C(13)-C(12)-C(11)	117.98(10)
C(6)-C(5)-C(4)	115.21(10)	F(1)-C(13)-C(12)	118.50(10)
N(1)-C(6)-C(5)	121.35(10)	F(1)-C(13)-C(14)	118.19(10)
N(1)-C(6)-Cl(1)	118.51(8)	C(12)-C(13)-C(14)	123.31(10)
C(5)-C(6)-Cl(1)	120.11(9)	C(13)-C(14)-C(15)	117.79(10)
C(8)-N(7)-C(5)	103.98(9)	C(14)-C(15)-C(10)	120.78(10)
N(7)-C(8)-N(9)	113.40(9)		

<sup>a</sup> Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 8-5: Torsionswinkel [°]<sup>a</sup>

C(6)-N(1)-C(2)-N(3)	1.35(18)	N(3)-C(4)-N(9)-C(8)	-179.49(11)
N(1)-C(2)-N(3)-C(4)	-0.96(17)	C(5)-C(4)-N(9)-C(8)	0.12(11)
C(2)-N(3)-C(4)-N(9)	178.39(11)	N(7)-C(8)-N(9)-C(4)	-0.57(12)
C(2)-N(3)-C(4)-C(5)	-1.15(16)	C(10)-C(8)-N(9)-C(4)	177.86(10)
N(3)-C(4)-C(5)-N(7)	179.96(10)	N(7)-C(8)-C(10)-C(11)	170.65(11)
N(9)-C(4)-C(5)-N(7)	0.33(12)	N(9)-C(8)-C(10)-C(11)	-7.62(16)
N(3)-C(4)-C(5)-C(6)	2.62(16)	N(7)-C(8)-C(10)-C(15)	-7.49(16)
N(9)-C(4)-C(5)-C(6)	-177.00(9)	N(9)-C(8)-C(10)-C(15)	174.24(10)
C(2)-N(1)-C(6)-C(5)	0.38(16)	C(15)-C(10)-C(11)-C(12)	0.74(17)
C(2)-N(1)-C(6)-Cl(1)	-177.54(8)	C(8)-C(10)-C(11)-C(12)	-177.38(10)
N(7)-C(5)-C(6)-N(1)	-178.69(11)	C(10)-C(11)-C(12)-C(13)	0.31(17)
C(4)-C(5)-C(6)-N(1)	-2.13(15)	C(11)-C(12)-C(13)-F(1)	178.29(10)
N(7)-C(5)-C(6)-Cl(1)	-0.79(18)	C(11)-C(12)-C(13)-C(14)	-1.00(17)
C(4)-C(5)-C(6)-Cl(1)	175.76(8)	F(1)-C(13)-C(14)-C(15)	-178.71(10)
C(6)-C(5)-N(7)-C(8)	176.01(12)	C(12)-C(13)-C(14)-C(15)	0.58(17)
C(4)-C(5)-N(7)-C(8)	-0.66(12)	C(13)-C(14)-C(15)-C(10)	0.53(17)
C(5)-N(7)-C(8)-N(9)	0.75(12)	C(11)-C(10)-C(15)-C(14)	-1.18(17)
C(5)-N(7)-C(8)-C(10)	-177.66(10)	C(8)-C(10)-C(15)-C(14)	177.01(10)

<sup>a</sup> Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

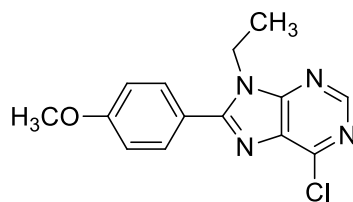
Tabelle 8-6: Wasserstoffbrücken [Å und °]<sup>a</sup>

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(9)-H(01)...N(3)#1	0.850(19)	2.08(2)	2.9243(14)	169.8(18)

<sup>a</sup> Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Benutzte Symmetrioperationen für die Generierung äquivalenter Atome:

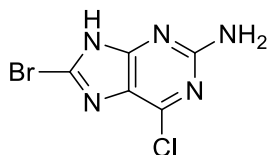
#1 -x+2,-y+1,-z+1

**6-Chlor-9-ethyl-8-(4-methoxyphenyl)-9H-purin (19)**

6-Chlor-8-(4-methoxyphenyl)-9H-purin (**18a**, 600 mg, 2.30 mmol) wurde unter Zusatz von  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (319 mg, 2.31 mmol) in DMF (7 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Jodethan (285  $\mu\text{L}$ , 3.50 mmol) wurde für 30 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wurde auf Wasser (20 mL) gegeben und über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Der ausgefallene Feststoff wurde abgesaugt und mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 1:3) aufgereinigt.

Es wurden 129 mg eines farblosen Feststoffes (20%) erhalten.

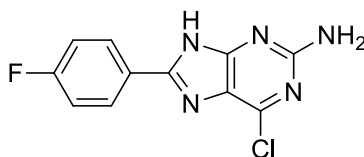
Schmp.: 124 – 126 °C; IR (KBr): 3432  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromatisch);  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1.37 (t,  $J$  = 7.23 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.88 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4.41 (q,  $J$  = 7.24 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.16 – 7.23 (m, 2H, ArH), 7.83 – 7.89 (m, 2H, ArH), 8.78 (s, 1H, ArH);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 14.48, 55.45 ( $\text{CH}_3$ ), 39.41 ( $\text{CH}_2$ ), 114.5, 130.9, 151.0 (CH), 120.8, 130.7, 147.7, 153.5, 155.7, 161.3 (C);  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{O}$  (288.73); ber. C 58.24, H 4.54, N 19.40, gef. C 58.38, H 4.73, N 19.13; MS (EI):  $m/z$  (%) = 288  $[\text{M}]^{+}$  (100); HPLC (isokratisch): 99.4% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  50:50),  $t_r$  = 3.55 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 249 nm, 299 nm und 305 nm; HPLC (Gradient): 97.5% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 10.6 min,  $t_m$  = 1.25 min.

**8-Brom-6-chlor-9H-purin-2-amin (22)<sup>116</sup>**

Zu einer Suspension aus 2-Amino-6-chlorpurin (415 mg, 2.44 mmol) in Essigsäure (10 mL) wurde Brom (700 µL, 13.6 mmol) langsam hinzugefügt. Anschließend wurde Wasser (2 mL) hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur Entfernung von überschüssigem Brom wurde Natriumthiosulfatlösung (0.2 mol/L) bis zur Entfärbung des Broms hinzugefügt. Die erhaltene Suspension wurde abgesaugt, mit Wasser nachgespült und der Feststoff mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Fließmittel: Ethylacetat) aufgereinigt.

Es wurden 246 mg eines farblosen Feststoffes (41%) erhalten.

Schmp.: 240 – 245 °C (Zers.); <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600.1 MHz): δ (ppm) = 6.91 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 13.64 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 150.9 MHz): δ (ppm) = 124.2, 126.4, 147.4, 156.1, 159.8 (C). Die gefundenen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.<sup>116</sup>

**6-Chlor-8-(4-fluorphenyl)-9H-purin-2-amin<sup>116</sup> (23)**

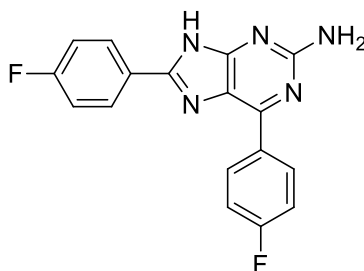
2-Amino-8-(4-fluorphenyl)-1H-purin-6(9H)-on (**30**, 166 mg, ca. 0.50 mmol) wurde als Rohprodukt eingesetzt und in POCl<sub>3</sub> (6 mL) unter Zusatz von *N,N*-Dimethylanilin (300 µL, 2.38 mmol) für 2 h zum Reflux erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Ansatz langsam unter Eiskühlung auf Eiswasser gegeben und mit einer NH<sub>3</sub>-Lösung (25%) neutralisiert (pH 7 – 8). Die erhaltene Suspension wurde nach Zugabe von 2 g Kieselgel zur Säulenchromatographie unter vermindertem Druck zur

Trockne eingengt. Es erfolgte eine Aufreinigung mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Fließmittel zu Beginn PE/EA 1:1, anschließend wurde das Produkt mit EA eluiert).

Es wurden 35 mg eines gelblichen Feststoffes (26%) erhalten.

Schmp.: 240 – 250 °C (Zers.);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 6.85 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.39 (m, 2H, ArH), 8.17 (m, 2H, ArH), 13.33 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 116.1 (d,  $J$  = 21.93 Hz), 128.8 (d,  $J$  = 8.78 Hz) (CH), 124.2, 125.9 (d,  $J$  = 2.96 Hz), 148.4, 149.3, 156.6, 159.8, 163.3 (d,  $J$  = 248.26 Hz). Die gefundenen Daten stimmen mit denen der Literatur überein<sup>116</sup>;  $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{ClFN}_5$  (263.65).

#### 6,8-Bis(4-fluorphenyl)-9H-purin-2-amin (24a)



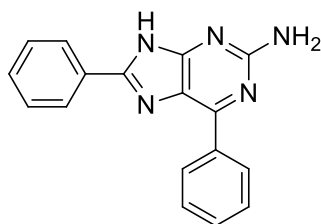
Die Verbindung **24a** wurde nach AAV 6 hergestellt. Dazu wurden 8-Brom-6-chlor-9H-purin-2-amin (**22**, 197 mg, 0.793 mmol) und 4-Fluorphenylboronsäure (335 mg, 2.39 mmol) unter Zusatz von  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (439 mg, 3.18 mmol) und  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (93.1 mg, 0.081 mmol) in Dioxan/Wasser (3:1, 4 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Fließmittel: Ethylacetat) und anschließender Umkristallisation aus Toluol aufgereinigt.

Es wurden 67.0 mg eines gelblichen Feststoffes (26%) erhalten.

Schmp.: 273 – 275 °C (Zers.); IR (KBr): 3411  $\text{cm}^{-1}$ , 3519  $\text{cm}^{-1}$  (NH,  $\text{NH}_2$ );  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 6.50 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.39 – 7.46 (m, 4H, ArH), 8.21 – 8.28 (m, 2H, ArH), 8.87 – 8.92 (m, 2H, ArH), 13.20 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 115.3 (d,  $J$  = 21.46 Hz), 116.1 (d,  $J$  = 21.06 Hz), 128.7 (d,  $J$  = 8.51 Hz), 131.4 (d,  $J$  = 8.60 Hz) (CH), 124.7, 126.3 (d,  $J$  = 2.93 Hz), 132.7, 148.8,

151.1, 157.2, 160.0, 163.2 (d,  $J = 247.9$  Hz), 163.5 (d,  $J = 248.2$  Hz) (C);  $C_{17}H_{11}F_2N_5$  (323.30); MS (EI):  $m/z$  (%) = 323  $[M]^{+}$  (100); HRMS (EI):  $m/z$   $[M]^{+}$  ber. 323.09770, gef. 323.09732; HPLC (isokratisch): 99.3% bei 254 nm und 99.5% bei 280 nm (ACN/H<sub>2</sub>O 50:50),  $t_r = 6.19$  min,  $t_m = 1.05$  min,  $\lambda_{max} = 257$  nm und 357 nm; HPLC (Gradient): 98.8% bei 254 nm (Methode A),  $t_r = 12.25$  min,  $t_m = 1.25$  min.

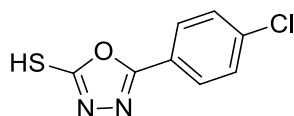
### 6,8-Diphenyl-9H-purin-2-amin (24b)



Die Verbindung **24b** wurde nach AAV 6 hergestellt. Dazu wurden 8-Brom-6-chlor-9H-purin-2-amin (**22**, 199 mg, 0.801 mmol) und Phenylboronsäure (292 mg, 2.39 mmol) unter Zusatz von K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (439 mg, 3.18 mmol) und Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (93.1 mg, 0.079 mmol) in Dioxan/Wasser (3:1, 4 mL) gegeben. Der erhaltene Feststoff wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Fließmittel: Ethylacetat) und anschließender Umkristallisation aus Toluol aufgereinigt.

Es wurden 30.1 mg eines gelblichen Feststoffes (13%) erhalten.

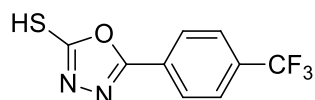
Schmp.: 254 – 256 °C (Zers.); IR (KBr): 3492 cm<sup>-1</sup>, 3388 cm<sup>-1</sup> (NH, NH<sub>2</sub>); <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 6.47 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.48 – 7.61 (m, 6H, ArH), 8.18 – 8.23 (m, 2H, ArH), 8.81 – 8.85 (m, 2H, ArH), 13.16 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 126.4, 128.3, 129.0, 129.1, 130.1, 130.3 (CH), 125.1, 129.7, 136.3, 149.5, 152.4, 157.1, 160.1 (C);  $C_{17}H_{13}N_5$  (287.12); MS (EI):  $m/z$  (%) = 287  $[M]^{+}$  (100); HRMS (EI):  $m/z$   $[M]^{+}$  ber. 287.11655, gef. 287.11583; HPLC (isokratisch): 99.6% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm (ACN/H<sub>2</sub>O 50:50),  $t_r = 4.17$  min,  $t_m = 1.05$  min,  $\lambda_{max} = 257$  nm und 357 nm; HPLC (Gradient): 99.9% bei 254 nm (Methode A),  $t_r = 11.43$  min,  $t_m = 1.25$  min.

**5-(4-Chlorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (25a)**

Die Verbindung **25a** wurde nach AAV 2 synthetisiert. Dazu wurde 4-Chlorbenzhydrazid (1.71 g, 10.0 mmol) unter Zusatz von KOH (561 mg, 10.0 mmol) in Ethanol 96% (30 mL) gelöst. Nach Zusatz von Schwefelkohlenstoff (622  $\mu$ L, 10.3 mmol) wurde für 6 h zum Rückfluss erhitzt. Der erhaltene Feststoff wurde aus Ethanol 96% umkristallisiert.

Es wurden 916 mg eines farblosen Feststoffes (43%) erhalten.

Schmp.: 175 – 176 °C (Lit.: 174 – 175°C)<sup>165</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 399.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 7.63 – 7.70 (m, 2H, ArH), 7.86 – 7.96 (m, 2H, ArH), 14.77 (s, 1H, NH/SH breit); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100.5 MHz):  $\delta$  (ppm) = 127.9, 129.6 (CH), 121.4, 136.9, 159.7, 177.5 (C); C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>ClN<sub>2</sub>OS (212.66).

**5-[(4-Trifluormethyl)phenyl]-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (25b)**

Die Verbindung **25b** wurde nach AAV 2 synthetisiert. Dazu wurde 4-(Trifluormethyl)benzhydrazid (469 mg, 2.30 mmol) unter Zusatz von KOH (144 mg, 2.57 mmol) in Ethanol 96% (8 mL) gelöst. Nach Zusatz von Schwefelkohlenstoff (152  $\mu$ L, 2.50 mmol) wurde für 6 h zum Rückfluss erhitzt. Der erhaltene Feststoff wurde aus Methanol umkristallisiert.

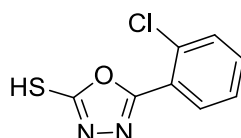
Es wurden 385 mg eines farblosen Feststoffes (68%) erhalten.

Schmp.: 165 – 167 °C (Lit.: 168 – 170 °C)<sup>166</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400.4 MHz):  $\delta$  (ppm) = 7.90 – 8.01 (m, 2H, ArH), 8.05 – 8.14 (m, 2H, ArH), 14.93 (s, breit, 1H,



NH/SH);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 100.7 MHz):  $\delta$  (ppm) = 126.3 (q,  $J$  = 3.64 Hz), 126.9 (CH), 123.6 (q,  $J$  = 272.6 Hz), 131.6 (q,  $J$  = 32.21 Hz), 159.3, 177.7 (C) (ein C nicht detektierbar);  $\text{C}_9\text{H}_5\text{F}_3\text{N}_2\text{OS}$  (246.21).

### 5-(2-Chlorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25c**)

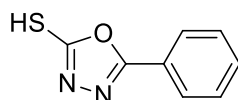


Die Verbindung **25c** wurde nach AAV 2 synthetisiert. Dazu wurde 2-Chlorbenzhydrazid (1.71 g, 10.0 mmol) unter Zusatz von KOH (587 mg, 10.5 mmol) in Ethanol 96% (30 mL) gelöst. Nach Zusatz von Schwefelkohlenstoff (723  $\mu\text{L}$ , 12.0 mmol) wurde für 6 h zum Rückfluss erhitzt. Der erhaltene Feststoff wurde aus Ethanol 96% umkristallisiert.

Es wurden 1.53 g eines farblosen Feststoffes (72%) erhalten.

Schmp.: 174 – 176 °C (Lit.: 174 – 175 °C)<sup>165</sup>;  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 399.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 7.54 – 7.60 (m, 1H, ArH), 7.62 – 7.73 (m, 2H, ArH), 7.89 – 7.95 (m, 1H, ArH), 14.92 (s, 1 H, SH/NH breit);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 100.5 MHz):  $\delta$  (ppm) = 127.9, 130.8, 131.2, 133.4 (CH), 121.3, 131.5, 158.4, 177.3 (C);  $\text{C}_8\text{H}_5\text{ClN}_2\text{OS}$  (212.66).

### 5-Phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25d**)

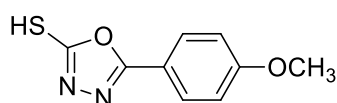


Die Verbindung **25d** wurde nach AAV 2 synthetisiert. Dazu wurde Benzhydrazid (1.37 g, 10.1 mmol) unter Zusatz von KOH (578 mg, 10.3 mmol) in Ethanol 96% (30 mL) gelöst. Nach Zusatz von Schwefelkohlenstoff (615  $\mu\text{L}$ , 10.2 mmol) wurde für 6 h zum Rückfluss erhitzt. Der erhaltene Feststoff wurde aus Methanol umkristallisiert.

Es wurden 934 mg eines farblosen Feststoffes (52%) erhalten.

Schmp.: 218 – 219 °C (Lit.: 218 – 220 °C)<sup>167</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400.4 MHz): δ (ppm) = 7.55 – 7.70 (m, 3H, ArH), 7.85 – 7.93 (m, 2H, ArH), 14.75 (s, 1H, NH/SH, breit); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100.7 MHz): δ (ppm) = 126.0, 129.4, 132.2 (CH), 122.4, 160.4, 177.4 (C); C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>OS (178.21).

#### 5-(4-Methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25e**)

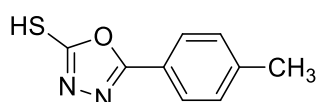


Die Verbindung **25e** wurde nach AAV 2 synthetisiert. Dazu wurde 4-Methoxybenzhydrazid (1.68 g, 10.1 mmol) unter Zusatz von KOH (578 mg, 10.3 mmol) in Ethanol 96% (50 mL) gelöst. Nach Zusatz von Schwefelkohlenstoff (622 µL, 10.3 mmol) wurde für 4 h zum Rückfluss erhitzt. Der erhaltene Feststoff wurde aus Ethanol 96% umkristallisiert.

Es wurden 1.30 g eines farblosen Feststoffes (62%) erhalten.

Schmp.: 202 – 203 °C (Lit.: 204 – 206 °C)<sup>168</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400.4 MHz): δ (ppm) = 3.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.09 – 7.18 (m, 2H, ArH), 7.78 – 7.87 (m, 2H, ArH), 14.62 (s, 1H, NH/SH breit); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100.7 MHz): δ (ppm) = 55.52 (CH<sub>3</sub>), 114.9, 127.9 (CH), 114.7, 160.5, 162.2, 177.1 (C); C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S (208.24).

#### 5-(4-Methylphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25f**)



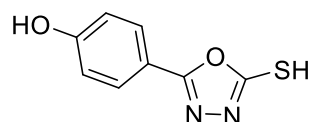
Verbindung **25f** wurde nach AAV 2 synthetisiert. Dazu wurde 4-Methylbenzhydrazid (1.50 g, 10.0 mmol) unter Zusatz von KOH (599 mg, 10.7 mmol) in Ethanol 96%

(30 mL) gelöst. Nach Zusatz von Schwefelkohlenstoff (622  $\mu$ L, 10.3 mmol) wurde für 6 h zum Rückfluss erhitzt. Der erhaltene Feststoff wurde aus Ethanol 96% umkristallisiert.

Es wurden 1.15 g eines farblosen Feststoffes (60%) erhalten.

Schmp.: 216 – 217 °C (Lit.: 217 – 218 °C)<sup>165</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400.4 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.36 – 7.44 (m, 2H, ArH), 7.73 – 7.81 (m, 2H, ArH), 14.68 (s, 1H, NH/SH breit); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100.7 MHz) :  $\delta$  (ppm) = 21.09 (CH<sub>3</sub>), 126.0, 129.9 (CH), 119.7, 142.5, 160.6, 177.3 (C); C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>OS (192.24).

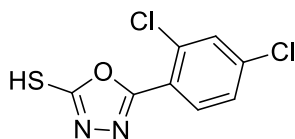
#### 4-(5-Mercapto-1,3,4-oxadiazol-2-yl)phenol (25g)



Die Verbindung **25g** wurde nach AAV 2 synthetisiert. Dazu wurde 4-Hydroxybenzhydrazid (1.53 g, 10.0 mmol) unter Zusatz von KOH (567 mg, 10.1 mmol) in Ethanol (30 mL) gelöst. Nach Zusatz von Schwefelkohlenstoff (660  $\mu$ L, 10.9 mmol) wurde für 7 h zum Rückfluss erhitzt. Der erhaltene Feststoff wurde aus Toluol/Ethanol umkristallisiert.

Es wurden 1.05 g eines farblosen Feststoffes (54%) erhalten.

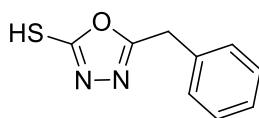
Schmp.: 225 – 226 °C (Lit.: 228 – 230 °C)<sup>169</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 399.8 MHz):  $\delta$  (ppm) = 6.90 – 7.00 (m, 2H, ArH), 7.66 – 7.78 (m, 2H, ArH), 10.39 (s, 1H, OH), 14.55 (s, 1H, NH/SH, breit); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100.5 MHz):  $\delta$  (ppm) = 116.2, 128.1 (CH), 113.1, 160.9, 161.1, 177.0 (C); C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S (194.21).

**5-(2,4-Dichlorphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (25h)**

Die Verbindung **25h** wurde nach AAV 2 synthetisiert. Dazu wurde 2,4-Dichlorbenzhydrazid (1.01 g, 4.91 mmol) unter Zusatz von KOH (270 mg, 4.81 mmol) in Ethanol 96% (15 mL) gelöst. Nach Zusatz von Schwefelkohlenstoff (363  $\mu$ L, 6.01 mmol) wurde für 7 h zum Rückfluss erhitzt. Der erhaltene Feststoff wurde aus Ethanol 96% umkristallisiert.

Es wurden 983 mg eines farblosen Feststoffes (81%) erhalten.

Schmp.: 170 – 171 °C (Lit.: 171 °C)<sup>170</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400.4 MHz):  $\delta$  (ppm) = 7.66 (dd, 1H, *J* = 2.1 Hz, 8.5 Hz, ArH), 7.90 – 7.95 (m, 2H, ArH), NH/SH-Signal konnte nicht detektiert werden; <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100.7 MHz):  $\delta$  (ppm) = 128.2, 130.8, 132.0 (CH), 120.4, 132.6, 137.3, 157.7, 177.3 (C); C<sub>8</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>OS (247.10).

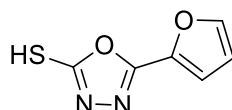
**5-Benzyl-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (25i)**

Die Verbindung **25i** wurde nach AAV 2 hergestellt. Dazu wurde Phenyllessigsäurehydrazid (1.49 g, 9.92 mmol) unter Zusatz von KOH (568 mg, 10.1 mmol) in Ethanol 96% (30 mL) gelöst. Nach Zusatz von Schwefelkohlenstoff (615  $\mu$ L, 10.2 mmol) wurde für 6 h zum Rückfluss erhitzt. Der erhaltene Feststoff wurde aus Methanol umkristallisiert.

Es wurden 1.29 g eines farblosen Feststoffes (68%) erhalten.

Schmp.: 123 – 124 °C (Lit.: 123 – 125 °C)<sup>127</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 399.9 MHz): δ (ppm) = 4.13 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.28 – 7.41 (m, 5H, ArH), 14.40 (s, breit, 1H, NH/SH); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100.5 MHz): δ (ppm) = 30.98 (CH<sub>2</sub>), 127.4, 128.7, 129.0 (CH), 133.4, 162.9, 177.8 (C); C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>OS (192.24).

### 5-(Furan-2-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25j**)

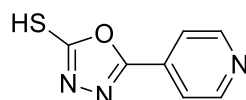


Die Verbindung **25j** wurde nach AAV 2 synthetisiert. Dazu wurde Furan-2-carbohydrazid (1.26 g, 9.99 mmol) unter Zusatz von KOH (549 mg, 9.78 mmol) in Ethanol 96% (30 mL) gelöst. Nach Zusatz von Schwefelkohlenstoff (615 µL, 10.2 mmol) wurde für 6 h zum Rückfluss erhitzt. Der erhaltene Feststoff wurde aus Methanol umkristallisiert.

Es wurden 612 mg eines farblosen Feststoffes (36%) erhalten.

Schmp.: 172 – 173 °C (Lit.: 177 - 179.5 °C)<sup>171</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 399.9 MHz): δ (ppm) = 6.79 (dd, 1H, *J* = 1.78 Hz, 3.60 Hz, ArH), 7.34 (dd, 1H, *J* = 0.77 Hz, 3.61 Hz, ArH), 8.05 (dd, 1H, *J* = 0.77 Hz, 1.78 Hz, ArH), 14.79 (s, breit, 1H, NH/SH); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100.5 MHz): 112.6, 115.0, 147.2 (CH), 137.5, 153.5, 176.7 (C); C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S (168.17).

### 5-(Pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25k**)



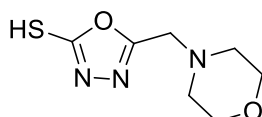
Die Verbindung **25k** wurde nach AAV 2 hergestellt. Dazu wurde Isonicotinsäurehydrazid (1.39 g, 10.1 mmol) unter Zusatz von KOH (584 mg, 10.4 mmol) in Ethanol 96% (30 mL) gelöst. Nach Zusatz von Schwefelkohlenstoff

(615  $\mu$ L, 10.2 mmol) wurde für 6 h zum Rückfluss erhitzt. Erhaltene Feststoff wurde aus Ethanol 96% umkristallisiert.

Es wurden 882 mg eines gelblichen Feststoffes (49%) erhalten.

Schmp.: 272 °C (Lit.: 272 °C)<sup>172</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 399.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 7.79 – 7.85 (m, 2H, ArH), 8.78 – 8.85 (m, 2H, ArH), NH/SH-Signal nicht detektierbar; <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100.5 MHz):  $\delta$  (ppm) = 119.6, 150.8 (CH), 129.8, 158.8, 177.7 (C); C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>OS (179.02).

### 5-(Morpholinomethyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25I**)



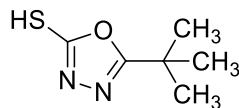
Die Verbindung **25I** wurde nach AAV 2 synthetisiert. Dazu wurde 2-Morpholinoacetohydrazid (**33a**, 740 mg, etwa 4.6 mmol) unter Zusatz von KOH (281 mg, 5.00 mmol) in Ethanol 96% (15 mL) gelöst. Nach Zusatz von Schwefelkohlenstoff (362  $\mu$ L, 6.00 mmol) wurde für 6 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur und Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde ein Feststoff erhalten, der in Wasser (15 mL) suspendiert wurde. Nach Zusatz von verdünnter Salzsäure (2 mol/L) bis zum neutralen pH (7-8) wurde das Produkt mit Ethylacetat (5 x 30 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Da das Produkt nicht quantitativ aus der wässrigen Phase extrahiert werden konnte, wurde diese ebenfalls unter vermindertem Druck zur Trockne eingeeengt. Die Rückstände aus beiden Phasen wurden vereint und mittels Säulenchromatographie an Kieselgel aufgereinigt (Fließmittel: Ethylacetat).

Es wurden 189 mg eines farblosen Feststoffes (20%) erhalten.

Schmp.: 148 – 150 °C (Lit.: 148 °C)<sup>173</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400.4 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.44 – 2.49 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>), 3.54 – 3.61 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>), 3.66 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 14.48

(s, 1H, NH/SH breit);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 100.7 MHz):  $\delta$  (ppm) = 51.5, 52.4, 65.9 (CH<sub>2</sub>), 160.6, 178.0 (C); C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S (201.25).

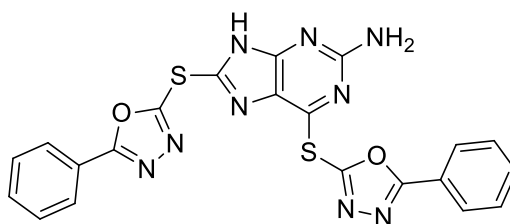
### 5-(*tert*-Butyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (25m)



Die Verbindung **25m** wurde nach AAV 2 synthetisiert. Dazu wurde 2,2-Dimethylpropionsäurehydrazid (856 g, 7.37 mmol) unter Zusatz von KOH (415 mg, 7.40 mmol) in Ethanol 96% (25 mL) gelöst. Nach Zusatz von Schwefelkohlenstoff (453  $\mu\text{L}$ , 7.50 mmol) wurde für 6 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Zusatz von verdünnter Salzsäure fiel kein Feststoff aus, daher wurde das Produkt aus der wässrigen Phase mit Ethylacetat extrahiert (4 x 25 mL). Da dies nicht quantitativ erfolgreich war, wurden beide Phasen unter vermindertem Druck zur Trockne eingeeengt und der erhaltene Rückstand in Dichlormethan (30 mL) aufgenommen und mit einer mit verdünnter Salzsäure (2 mol/L) angesäuerten wässrigen Phase (3 x 15 mL) ausgeschüttelt. Nach Einengen der Dichlormethanphasen unter vermindertem Druck wurde ein Rückstand erhalten, der mittels Säulenchromatographie an Kieselgel aufgereinigt wurde (Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 1:1).

Es wurden 559 mg eines farblosen Feststoffes (48%) erhalten.

Schmp.: 79 – 81 °C (Literatur: 79 – 80 °C)<sup>174</sup>;  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 399.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1.30 (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>), 14.34 (s, 1H, NH/SH, breit);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 100.5 MHz):  $\delta$  (ppm) = 26.98 (3 x CH<sub>3</sub>), 32.1, 169.8, 177.8 (C); C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>OS (158.22).

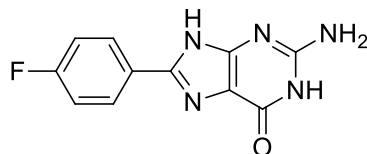
**6,8-Bis[(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thio]-9H-purin-2-amin (27)**

Die Verbindung **27** wurde aus 8-Brom-6-chlor-9H-purin-2-amin (**22**, 248 mg, 0.998 mmol) und 5-Phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25d**, 446 mg, 2.50 mmol) unter Zusatz von Triethylamin (347  $\mu$ L, 2.50 mmol) durch Erhitzen in Propan-2-ol (10 mL) auf 85 °C für 24 h gewonnen. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur fiel ein Feststoff aus, der abgesaugt und mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Fließmittel: PE/EA 1:3) und anschließender Umkristallisation aus Ethylacetat aufgereinigt wurde.

Es wurden 150 mg eines farblosen Feststoffes (31%) erhalten.

Schmp.: 204 – 206 °C (Zers.); IR (KBr): 3349  $\text{cm}^{-1}$ , 3479  $\text{cm}^{-1}$  (NH,  $\text{NH}_2$ );  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 6.80 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.55 – 7.70 (m, 6H, ArH), 7.95 – 8.06 (m, 4H, ArH), 13.54 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 126.7, 126.8, 129.4, 129.5, 132.4, 132.5 (CH), 122.8, 123.1, 124.4, 138.9, 153.8, 155.0, 156.6, 158.1, 159.8, 166.5, 167.4 (C);  $\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{N}_9\text{O}_2\text{S}_2$  (487.52); MS (EI):  $m/z$  (%) = 487  $[\text{M}]^{+}$  (14), 178 (100), 145 (58), 118 (61), 103 (87), 77 (58); HRMS (EI):  $m/z$   $[\text{M}]^{+}$  ber. 487.06281, gef. 487.06305; HPLC (isokratisch): 99.5% bei 254 nm und 99.2% bei 280 nm (ACN/Puffer 50:50),  $t_r$  = 3.65 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{\text{max}}$  = 227 nm, 258 nm und 329 nm; HPLC (Gradient): 97.2% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 10.80 min,  $t_m$  = 1.25 min.

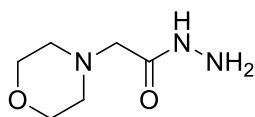


**2-Amino-8-(4-fluorphenyl)-1*H*-purin-6(9*H*)-on<sup>175</sup> (30)**

2-Amino-8-brom-1*H*-purin-6(9*H*)-on (114 mg, 0.497 mmol) und (4-Fluorphenyl)-boronsäure (140 mg, 1.00 mmol) wurden unter Zusatz von  $K_2CO_3$  (278 mg, 2.01 mmol) und  $Pd(PPh_3)_4$  (59.1 mg, 0.05 mmol) in Dioxan/Wasser (3:1, 3 mL) gegeben und in einer Mikrowellenreaktion umgesetzt. Folgende Parameter wurden dafür gewählt: Leistung 100 W, Temperatur 130 °C, Reaktionszeit 1 h, *ramp time* 5:00 und ein Maximaldruck von 150 psi. Nach Ende der Reaktion wurde der Ansatz mit Wasser (3 mL) in einen Kolben gespült und mit 1N HCl neutralisiert (pH 7 – 8). Das Reaktionsgemisch wurde anschließend unter vermindertem Druck zur Trockne eingeeengt und der erhaltene Rückstand in Wasser (10 mL) suspendiert. Der Feststoff wurde abgesaugt und mittels Säulenchromatographie an Kieselgel aufgereinigt. (Fließmittel zu Beginn DCM/Ethanol 1:1, zur Elution des Produktes: Ethanol).

Es wurden 35.6 mg (31%) eines gelblichen Feststoffes erhalten.

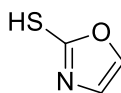
Schmp.: 270 – 280 °C (Zers.); IR (KBr): 3320, 3143  $cm^{-1}$  (NH,  $NH_2$ ), 1666 (C=O);  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 6.22 (s, 0.6 H,  $NH_2$ ), 6.44 (s, 2H,  $NH_2$ ), 7.32 (m, 2.6H, ArH), 8.03 (m, 2H, ArH), 8.16 (m, 0.6H, ArH), 10.62 (s, 1H, NH/OH), 10.74 (s, 0.3H, NH/OH), 12.83 (s, 1H, NH), 13.22 (s, 0.3H, NH); 1. Signalsatz:  $^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 115.9 (d,  $J$  = 21.52 Hz), 128.6 (d,  $J$  = 8.40 Hz) (CH), 109.7, 126.3 (d,  $J$  = 2.95 Hz), 149.3, 152.9, 154.1, 160.1, 162.9 (d,  $J$  = 247.56 Hz) (q); 2.Signalsatz:  $^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 115.8 (d,  $J$  = 21.87 Hz), 127.4 (d,  $J$  = 8.40 Hz) (CH), 117.5, 126.9 (d,  $J$  = 2.92 Hz), 143.8, 153.4, 153.6, 156.7, 163.4 (d,  $J$  = 246.14 Hz) (C);  $C_{11}H_8FN_5O$  (245.21); MS (EI):  $m/z$  (%) = 245  $[M]^+(100)$ ; HPLC (isokratisch): 98.3% bei 254 nm und 98.7% bei 280 nm (ACN/ $H_2O$  20:80),  $t_r$  = 3.59 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{max}$  = 229 nm, 250 nm und 304 nm; HPLC (Gradient): 97.3% bei 254 nm (Methode A),  $t_r$  = 7.44 min,  $t_m$  = 1.25 min.

**2-Morpholinoacetohydrazid (33a)**

2-Morpholinoessigsäuremethylester (795  $\mu\text{L}$ , 5.00 mmol) und Hydrazinhydrat (363  $\mu\text{L}$ , 7.48 mmol) wurden in 5 mL Methanol gegeben und für 6.5 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt und unter vermindertem Druck eingengt. Der erhaltene ölige Rückstand wurde ohne weitere Aufarbeitung für die Synthese von 5-(Morpholinomethyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**25I**) eingesetzt.

Es wurden 780 mg eines schwach gelblichen Öles (98%) erhalten.

$^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 399.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.35 – 2.44 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 2.90 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.53 – 3.61 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 4.18 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 8.91 (s, 1H, NH),  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 100.5 MHz):  $\delta$  (ppm) = 53.23, 60.13, 66.02 ( $\text{CH}_2$ ) 168.0 (C). Die gefundenen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.<sup>131</sup>

**2- Mercaptooxazol (36)**

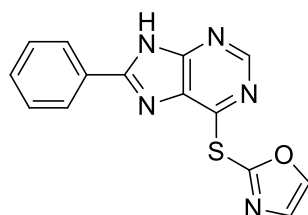
KSCN (3.00 g, 30.9 mmol) wurde in Acetonitril (75 mL) suspendiert. Nachdem konzentrierte Salzsäure (1190  $\mu\text{L}$ ) tropfenweise und unter Rühren hinzugegeben wurde, wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde filtriert und zu der Lösung wurde Glycolaldehyddimer (1.19 g, 9.91 mmol) gegeben und für vier Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Ansatz unter Vakuum zur Trockne eingengt und der erhaltene Feststoff in Wasser (50 mL) suspendiert und mit Ethylacetat (3 x 100 mL) extrahiert. Die

vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Der erhaltene Feststoff wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Fließmittel: Ethylacetat/Hexan 2:1) aufgereinigt.

Es wurden 160 mg eines farblosen Feststoffes (16%) erhalten.

Schmp.: 133°C (Lit.: 136 – 138 °C)<sup>138</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 399.9 MHz): δ (ppm) = 7.37 (d, 1H, *J* = 1.61 Hz, ArH), 7.76 (d, 1H, *J* = 1.61 Hz, ArH), 13.1 (1H, s, NH/SH, breit); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100.5 MHz): δ (ppm) = 117.3, 137.7 (CH), 178.3 (C); C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>NOS (101.13).

## 2-[(8-Phenyl-9*H*-purin-6-yl)thio]oxazol (38)



Verbindung **38** wurde nach AAV 4 synthetisiert. Dazu wurden Oxazol-2-thiol (**36**, 84.6 mg, 0.836 mmol) und 6-Chlor-8-phenyl-9*H*-purin (**18a**, 145 mg, 0.629 mmol) unter Zusatz von DIEPA (136 µL, 0.800) in DMF (1.5 mL) gegeben. Die Reaktionszeit betrug in diesem Fall 40 min. Der erhaltene Feststoff wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel aufgereinigt (Fließmittel: Ethylacetat/Petrolether 2:1).

Es wurden 54.7 mg eines gelblichen Feststoffes (29%) erhalten.

Schmp.: 241 – 242 °C (Zers.); IR (KBr): 3457 cm<sup>-1</sup> (NH); <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600.1 MHz): δ (ppm) = 7.58 (d, 1H, *J* = 0.92 Hz, ArH), 7.59 – 7.61 (m, 3H, ArH), 8.18 – 8.22 (m, 2H, ArH), 8.51 (d, 1H, *J* = 0.93 Hz, ArH), 8.64 (s, 1H, ArH), 14.20 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 150.9 MHz): δ (ppm) = 127.1, 129.0, 130.0, 131.3, 144.9, 150.6 (CH), 128.4, 131.0, 151.5, 152.3, 153.0, 154.0 (C); C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>N<sub>5</sub>OS (295.32); MS (EI):

$m/z$  (%) = 295  $[M]^{+}$  (100), 253  $[M^{+} - 42]$  (3), 195 (41); HRMS (EI):  $m/z$   $[M]^{+}$  ber. 295.05223, gef. 295.05247; HPLC (isokratisch): 98.2% bei 254 nm und 96.4% bei 280 nm (ACN/H<sub>2</sub>O 40:60),  $t_r$  = 3.09 min,  $t_m$  = 1.05 min,  $\lambda_{max}$  = 238 nm und 309 nm; HPLC (Gradient): 96.5% bei 254 nm (Methode C),  $t_r$  = 10.97 min,  $t_m$  = 1.25 min.

## 8.4 Löslichkeitsuntersuchungen

### Kalibrierung:

1 mg der Probensubstanz wird exakt eingewogen und mit DMSO zu einer 10 mM Stammlösung gelöst. Aus dieser wird durch Verdünnung mit ACN eine 200 µM-Kalibrierlösung I erstellt. Diese Kalibrierlösung I wird wiederum mit ACN weiter verdünnt zu Kalibrierlösung II (20 µM) und Kalibrierlösung III (4 µM). Die Kalibrierlösungen I-III werden mittels HPLC vermessen und die integrierten Flächen der Substanzsignale in ihren Maxima (AUC) gegen die Konzentration aufgetragen. Die Stamm- und Kalibrierlösungen werden jeweils einfach hergestellt.

Tabelle 8-7: Erstellung der Stamm- und Kalibrierlösungen

Stammlösung (10 mM)	$V (\mu\text{L}) = \frac{m (\text{mg})}{M \left( \frac{\text{mg}}{\text{mmol}} \right) * c \left( \frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right)} * 10^6$
Kalibrierlösung I (200 µM)	8 µL der Stammlösung + 392 µL ACN
Kalibrierlösung II (20 µM)	40 µL der Kalibrierlösung I + 360 µL ACN
Kalibrierlösung III (4 µM)	8 µL der Kalibrierlösung I + 392 µL ACN

### Vorbereitung und Vermessung der Proben:

300 µg der Testverbindungen werden exakt in Whatman-UniPrep® Vials eingewogen und mit 400 µL Pufferlösung versetzt. Das Vial wird mit dem Filterdeckel verschlossen, ohne diesen vollständig durchzudrücken und mit Verschlussfolie (Parafilm "M", Bemis Flexible Packaging, Neenah, WI, USA) umwickelt. Anschließend erfolgt eine Inkubation bei folgenden Bedingungen: Temperatur: 25 °C und Schüttelfrequenz: 400 rpm. Die Probenmessung geschieht nach 24 h und 48 h, wobei überprüft wird, ob es bereits nach 24 h zur Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen gelöster und ungelöster Form kommt. Bei stärkeren Abweichungen zwischen beiden Messzeitpunkten sollte eine weitere Messung nach 72 h erfolgen. Zur Messung der Probe wird der Filter durchgedrückt, um den festen ungelösten Anteil von der Lösung abzutrennen. Die Messung der Proben erfolgt mittels HPLC mit einem UV-Detektor in einer isokratischen Methode, wobei die AUC jeweils bei  $\lambda_{\text{max}}$  der Substanz bestimmt wird.

### **Phosphat-Pufferlösung pH 7.4, natriumchloridhaltige R**

Die Herstellung des Puffers erfolgt gemäß Ph. Eur. (8. Ausgabe, Nachtrag 8.3):

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ : 289.4 mg
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 19 mg
- $\text{NaCl}$ : 800.0 mg
- $\text{H}_2\text{O}$ : ad 100.0 mL

Die Einstellung des pH-Wertes 7.4 erfolgt mit verdünnter Salzsäure unter Verwendung eines pH-Meters mit Glaselektrode.

### **Bedingungen HPLC:**

Folgende Parameter werden für die HPLC-Untersuchungen der Probelösungen und der Kalibrierlösungen gewählt:

- Injektionsvolumen: 15  $\mu\text{L}$
- Fließmittel: ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ : Verhältnis abhängig von der Probesubstanz (siehe experimentelle Daten)
- Fließgeschwindigkeit: 1.000 mL/min
- Detektion: mittels Dioden-Array-Detektor (DAD) in den substanzspezifischen Maxima ( $\lambda_{\text{max}}$ )

## 8.5 Proteinkinase-Assay und biologische Daten

Die Aktivitätsdaten der synthetisierten Verbindungen wurden von der Firma ProQinase (Freiburg im Breisgau) bestimmt. Die Proteinkinasen wurden in Sf9-Insektenzellen oder E.coli als rekombinante GST-Fusionsproteine oder als Polyhistidin-markierte Proteine exprimiert. Eine anschließende Affinitätschromatographie unter Verwendung von GSH-Agarose oder Ni-NTA-Agarose diente der Aufreinigung. Die Identitätsprüfung erfolgte durch Massenspektrometrie und die Reinheitsprüfung durch eine SDS-PAGE unter Verwendung einer Coomassie-Färbung.

Die IC<sub>50</sub>-Werte der Testverbindungen wurden in einem radiometrischen Assay unter Verwendung von  $\gamma$ -<sup>33</sup>ATP bestimmt (<sup>33</sup>PanQinase® Activity Assay). Die Vermessung wurde in 96-Well FlashPlates™ (Perkin, Elmer, Boston, MA, USA) mit einem Reaktionsvolumen von jeweils 50  $\mu$ L durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde durch Zugabe der einzelnen Komponenten in folgenden Schritten hergestellt:

- 20  $\mu$ L Standardpuffer (nach ProQinase GmbH)
- 5  $\mu$ L ATP-Lösung (in H<sub>2</sub>O)
- 5  $\mu$ L Probelösung (10% DMSO)
- 20  $\mu$ L einer Mischung aus je 10  $\mu$ L Substrat- und Enzymlösung

Der Assay enthielt 70 nM HEPES-NaOH (pH 7.5), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM MnCl<sub>2</sub>, 3  $\mu$ M Na-*ortho*-Vanadat, 1.2 mM DTT, 50  $\mu$ g/mL PEG<sub>2000</sub>, ATP (0.3 – 1.0  $\mu$ M),  $\gamma$ -<sup>33</sup>ATP (1-7x10<sup>5</sup> cpm pro well). Die verwendeten Enzym- und Substratkonzentrationen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 8-8: Enzym- und Substratkonzentrationen pro *well* der untersuchten Kinase

Kinase	c(Kinase) [ng/50 µL]	Substrat	c(Substrat) [µg/50 µL]
<b>ALK C1156Y</b>	20-25	poly(Glu,Tyr)4:1	0.125
<b>ALK F1174L</b>	20-25	poly(Glu,Tyr)4:1	0.125
<b>ALK F1174S</b>	150-200	poly(Glu,Tyr)4:1	0.125
<b>ALK L1196M</b>	20-30	poly(Glu,Tyr)4:1	0.125
<b>ALK R1275Q</b>	20-25	poly(Glu,Tyr)4:1	0.125
<b>ALK wt</b>	20-30	poly(Glu,Tyr)4:1	0.125
<b>AXL</b>	25	poly(Glu,Tyr)4:1	0.250
<b>FAK aa2-1052</b>	25	poly(Glu,Tyr)4:1	0.125
<b>MET</b>	10-20	poly(Ala,Glu,Lys,Tyr) 6:2:5:1	0.125
<b>NPM1-ALK</b>	10-25	poly(Glu,Tyr)4:1	0.125
<b>NPM1-ALK F1174L</b>	10	poly(Glu,Tyr)4:1	0.125
<b>SRC</b>	10	poly(Glu,Tyr)4:1	0.125
<b>IGF1-R</b>	10	poly(Glu,Tyr)4:1	0.125
<b>PIM</b>	2	GSK3(14-27)	1
<b>PRK1</b>	25	RBER-CHKtide	2
<b>VEGF-R2</b>	10-25	poly(Glu,Tyr)4:1	0.125
<b>TYRO3</b>	20	poly(Glu,Tyr)4:1	0.500

Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 30 °C wurde die Reaktion jeweils durch Zugabe einer 2% (v/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung (50 µL) beendet und die Platten zweimal mit 200 µL H<sub>2</sub>O oder 200 µL einer 0.9%igen (w/v) Natriumchloridlösung gewaschen. Gebundenes <sup>33</sup>P<sub>i</sub> wurde mittels Mikroplatten-Szintillationszähler (Microbeta, Wallac) vermessen. Alle Assays wurden in einem BeckmanCoulter/SAGIAN™ Core System durchgeführt.



Bestimmt wurde jeweils die Restaktivität des Enzyms. Dazu dienten die *high control* und die *low control* Werte. Die *high control* Werte wurden mit Kontrollproben ohne Inhibitor bestimmt und zeigen somit die absolute Enzymaktivität. Die Proben der *low control* Werte enthielten nur Substrat, aber kein Enzym und keinen Inhibitor.

Die Restaktivität berechnet sich dann nach folgender Formel:

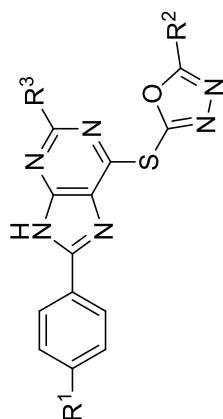
$$\text{Restaktivität [\%]} = \frac{\text{Messergebnis der Testsubstanz} - \text{low control}}{\text{high control} - \text{low control}} * 100\%$$

Die Restaktivitäten und die IC<sub>50</sub>-Werte der Testsubstanzen wurden mit dem Programm Quattro Workflow V3.0.6 (Quattro Research GmbH, München) berechnet. Es wurden jeweils 10 Konzentrationen der Verbindungen im Bereich von 1x10<sup>-4</sup> M und 3x10<sup>-9</sup> M vermessen.

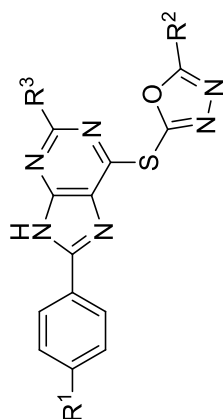
Zum Teil wurde bei höheren Konzentrationen auf Grund der schlechten Löslichkeit eine Präzipitation der Probesubstanzen beobachtet. In diesem Fall wurden dann die höheren Konzentrationen aus der Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte ausgelassen.

Zur Beurteilung der Assayqualität wurde der Z-Faktor für die *low* und *high control*-Proben bestimmt.<sup>176</sup> Das Akzeptanzkriterium der Firma ProQinase liegt bei einem Z-Faktor von über 0.4. Hier lag der Z-Faktor in allen Fällen über 0.7, sodass eine exzellente Assayqualität nachgewiesen wurde.

In den folgenden Tabellen werden die IC<sub>50</sub>-Werte aller Testverbindungen aufgeführt (Tabelle 8-9 – Tabelle 8-18, nb = nicht bestimmt).

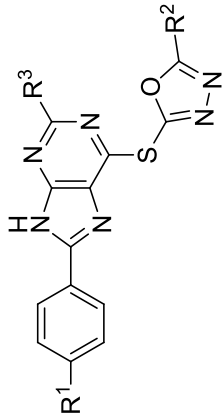
Tabelle 8-9: IC<sub>50</sub>-Werte [μM] der Verbindungen **1**, **12a-k** an ALK wt, verschiedenen Mutanten und Fusionsproteinen

Nr.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	ALK wt	ALK L1196M	ALK C1156Y	ALK F1174L	ALK F1174S	ALK R1275Q	NPM1-ALK	NPM1-ALK F1174L
<b>1</b>		<b>Crizotinib</b>		0.021	0.233	0.033	0.035	0.039	0.021	0.034	0.054
<b>12a</b>	OCH <sub>3</sub>	4-Cl-Phenyl	H	0.961	1.17	1.13	1.45	1.68	0.885	0.969	1.62
<b>12b</b>	F	4-Cl-Phenyl	H	0.816	0.822	1.10	1.17	nb	0.854	0.712	0.752
<b>12c</b>	H	4-Cl-Phenyl	H	5.95	7.00	8.90	9.09	10.4	6.52	9.34	nb
<b>12d</b>	OCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> -Phenyl	H	2.08	1.95	nb	4.27	nb	1.72	2.88	2.65
<b>12e</b>	OCH <sub>3</sub>	4-OCH <sub>3</sub> -Phenyl	H	4.81	4.95	4.07	6.04	14.4	3.90	3.82	7.02
<b>12f</b>	OCH <sub>3</sub>	4-CF <sub>3</sub> -Phenyl	H	1.90	1.86	2.15	3.29	3.69	1.16	1.99	2.04
<b>12g</b>	OCH <sub>3</sub>	2-Cl-Phenyl	H	4.80	5.08	3.94	5.39	7.77	3.57	4.99	5.61
<b>12i</b>	OCH <sub>3</sub>	<i>tert</i> -Butyl	H	31.4	41.0	nb	> 100	nb	34.5	46.8	> 100
<b>12j</b>	F	4-CF <sub>3</sub> -Phenyl	H	1.95	4.80	7.92	8.22	nb	2.50	1.54	2.17
<b>12k</b>	F	Phenyl	H	6.01	4.68	nb	2.73	nb	6.88	4.92	5.66

Tabelle 8-10: IC<sub>50</sub>-Werte [ $\mu$ M] der Verbindungen **12l-u** an ALK wt, verschiedenen Mutanten und Fusionsproteinen

Nr.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	ALK wt	ALK L1196M	ALK C1156Y	ALK F1174L	ALK F1174S	ALK R1275Q	NPM1-ALK	NPM1-ALK F1174L
<b>12l</b>	F	4-OCH <sub>3</sub> -Phenyl	H	4.98	4.94	5.16	7.16	8.87	5.56	5.01	4.66
<b>12m</b>	OCH <sub>3</sub>	2-CH <sub>3</sub> -Phenyl	H	2.06	1.81	2.30	2.35	nb	2.25	1.84	2.24
<b>12n</b>	OCH <sub>3</sub>	2,4-di-Cl-Phenyl	H	0.457	0.875	1.73	2.30	nb	0.332	0.322	0.313
<b>12o</b>	OCH <sub>3</sub>	Benzyl	H	51.7	30.9	66.9	47.3	38.0	> 100	69.7	nb
<b>12p</b>	OCH <sub>3</sub>	4-Pyridyl	H	9.64	9.40	14.7	12.8	13.8	9.99	6.64	> 100
<b>12q</b>	OCH <sub>3</sub>	4-OH-Phenyl	H	2.99	3.04	4.72	5.72	nb	3.17	3.09	4.30
<b>12r</b>	OCH <sub>3</sub>	Morpholinomethyl	H	> 100	> 100	> 100	> 100	nb	> 100	> 100	> 100
<b>12s</b>	H	4-CH <sub>3</sub> -Phenyl	H	10.5	7.16	11.8	10.1	19.8	10.5	22.9	nb
<b>12t</b>	H	4-OCH <sub>3</sub> -Phenyl	H	4.29	3.12	4.10	4.83	6.65	3.54	5.74	nb
<b>12u</b>	H	4-CF <sub>3</sub> -Phenyl	H	0.857	0.963	1.11	1.13	1.36	0.977	0.965	0.961

Tabelle 8-11: IC<sub>50</sub>-Werte [μM] der Verbindungen **12v-ad** und **13a,b** an ALK *wt*, verschiedenen Mutanten und Fusionsproteinen



Nr.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	ALK <i>wt</i>	ALK L1196M	ALK C1156Y	ALK F1174L	ALK F1174S	ALK R1275Q	NPM1-ALK	NPM1-ALK F1174L
12v	H	2-Cl-Phenyl	H	8.81	6.04	3.88	6.62	22.9	5.19	31.8	nb
12w	H	Phenyl	H	> 100	7.36	9.79	14.7	27.7	32.1	51.0	nb
12x	H	2,4-di-Cl-Phenyl	H	1.60	1.93	2.00	2.12	4.67	1.34	0.388	1.85
12y	H	Benzyl	H	75.5	54.6	98.8	63.2	58.5	98.8	> 100	> 100
12z	H	4-Pyridyl	H	26.6	51.1	53.6	41.8	29.4	41.0	57.6	47.0
12aa	H	Furyl	H	22.5	18.0	52.1	27.8	25.8	27.5	41.3	33.6
12ab	F	2-Cl-Phenyl	H	6.34	7.12	7.38	10.0	8.58	5.59	4.84	5.29
12ac	F	2,4-di-Cl-Phenyl	H	5.18	3.58	nb	3.10	nb	7.55	3.45	3.55
12ad	F	4-Pyridyl	H	> 100	> 100	> 100	> 100	nb	> 100	> 100	> 100
13a	F	4-Cl-Phenyl	NH <sub>2</sub>	13.5	12.1	nb	37.4	nb	14.4	33.6	39.3
13b	F	2,4-di-Cl-Phenyl	NH <sub>2</sub>	13.0	4.58	nb	15.1	nb	6.18	9.72	13.7

Tabelle 8-12: IC<sub>50</sub>-Werte [μM] der Verbindungen **14** und **15a-c** an ALK *wt*, verschiedenen Mutanten und Fusionsproteinen

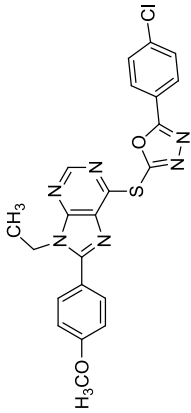
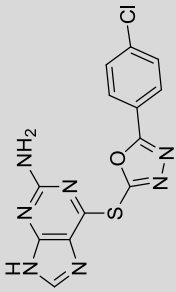
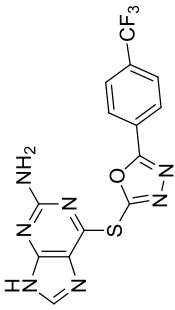
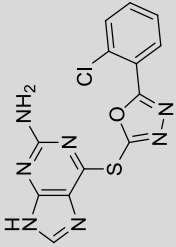
Nr.	Struktur	ALK <i>wt</i>	ALK L1196M	ALK C1156Y	ALK F1174L	ALK F1174S	ALK R1275Q	NPM1-ALK	NPM1-ALK F1174L
<b>14</b>		8.12	3.59	nb	33.6	nb	11.9	6.66	3.72
<b>15a</b>		21.1	13.1	nb	77.8	nb	25.6	> 100	58.4
<b>15b</b>		21.4	16.0	nb	67.6	nb	13.6	51.0	38.4
<b>15c</b>		18.6	17.2	nb	23.7	nb	21.0	36.4	25.5

Tabelle 8-13: IC<sub>50</sub>-Werte [μM] der Verbindungen **24a**, **b**, **27** und **38** an ALK wt, verschiedenen Mutanten und Fusionsproteinen

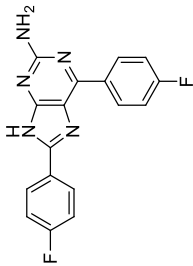
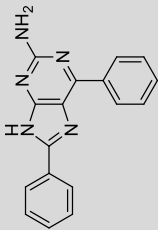
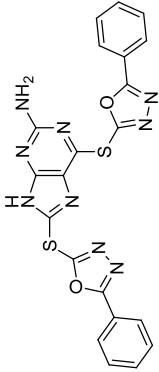
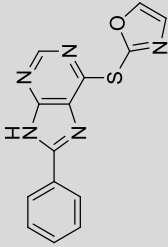
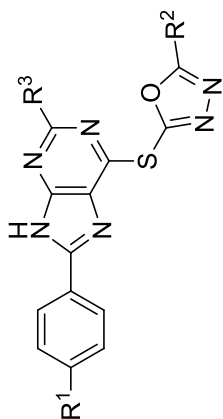
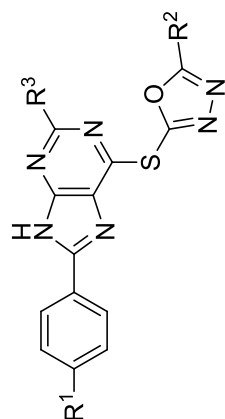
Nr.	Struktur	ALK wt	ALK L1196M	ALK C1156Y	ALK F1174L	ALK F1174S	ALK R1275Q	NPM1-ALK	NPM1-ALK F1174L
<b>24a</b>		4.99	3.43	nb	9.76	nb	5.37	11.2	16.4
<b>24b</b>		6.54	4.46	nb	8.22	nb	7.16	6.66	10.8
<b>27</b>		23.0	13.4	nb	46.0	nb	24.6	62.4	56.9
<b>38</b>		93.5	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	nb

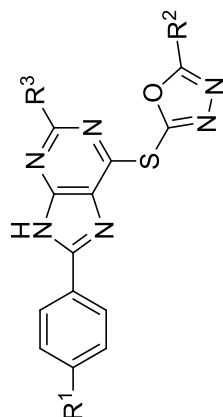
Tabelle 8-14: IC<sub>50</sub>-Werte [ $\mu$ M] der Verbindungen **1** und **12a-k** an verschiedenen tumorrelevanten Kinasen

Nr.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	cMet	AXL	FAK aa2- 1052	SRC	IGF1-R	PIM1	PRK1	VEGF-R2	TYRO3
<b>1</b>		<b>Crizotinib</b>		0.104	0.067	0.059	0.776	nb	nb	nb	nb	nb
<b>12a</b>	OCH <sub>3</sub>	4-Cl-Phenyl	H	66.7	5.75	3.48	nb	nb	nb	nb	2.51	nb
<b>12b</b>	F	4-Cl-Phenyl	H	6.89	28.7	1.38	nb	nb	nb	nb	1.01	13.3
<b>12c</b>	H	4-Cl-Phenyl	H	> 100	> 100	9.71	2.79	2.21	> 100	> 100	2.58	nb
<b>12d</b>	OCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> -Phenyl	H	33.3	8.85	8.16	nb	nb	nb	nb	2.26	5.01
<b>12e</b>	OCH <sub>3</sub>	4-OCH <sub>3</sub> -Phenyl	H	> 100	10.8	38.2	nb	nb	nb	nb	7.28	nb
<b>12f</b>	OCH <sub>3</sub>	4-CF <sub>3</sub> -Phenyl	H	> 100	6.13	3.51	nb	nb	nb	nb	2.05	nb
<b>12g</b>	OCH <sub>3</sub>	2-Cl-Phenyl	H	> 100	10.3	13.3	nb	nb	nb	nb	7.56	nb
<b>12i</b>	OCH <sub>3</sub>	<i>tert</i> -Butyl	H	75.5	81.5	> 100	nb	nb	nb	nb	53.9	> 100
<b>12j</b>	F	4-CF <sub>3</sub> -Phenyl	H	22.8	8.55	8.53	nb	nb	nb	nb	4.47	2.97
<b>12k</b>	F	Phenyl	H	33.6	12.3	> 100	nb	nb	nb	nb	5.01	7.58

Tabelle 8-15: IC<sub>50</sub>-Werte [ $\mu$ M] der Verbindungen **12l-u** an verschiedenen tumorrelevanten Kinasen

Nr.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	cMet	AXL	FAK					PRK1	VEGF-R2	TYRO3
						aa2-1052	SRC	IGF1-R	PIM1				
12l	F	4-OCH <sub>3</sub> -Phenyl	H	> 100	27.6	11.4	nb	nb	nb	nb	6.16	nb	
12m	OCH <sub>3</sub>	2-CH <sub>3</sub> -Phenyl	H	> 100	3.62	2.64	nb	nb	nb	nb	2.02	2.93	
12n	OCH <sub>3</sub>	2,4-di-Cl-Phenyl	H	> 100	0.605	1.83	nb	nb	nb	nb	1.60	> 100	
12o	OCH <sub>3</sub>	Benzyl	H	> 100	84.3	> 100	50.7	24.5	> 100	> 100	21.5	nb	
12p	OCH <sub>3</sub>	4-Pyridyl	H	> 100	20.9	10.6	nb	nb	nb	nb	> 100	nb	
12q	OCH <sub>3</sub>	4-OH-Phenyl	H	> 100	9.53	11.7	nb	nb	nb	nb	3.99	6.77	
12r	OCH <sub>3</sub>	Morpholinomethyl	H	> 100	> 100	83.0	nb	nb	nb	nb	85.9	> 100	
12s	H	4-CH <sub>3</sub> -Phenyl	H	> 100	81.4	> 100	19.9	6.40	> 100	> 100	5.32	nb	
12t	H	4-OCH <sub>3</sub> -Phenyl	H	> 100	10.7	> 100	14.0	4.09	> 100	> 100	3.27	nb	
12u	H	4-CF <sub>3</sub> -Phenyl	H	> 100	> 100	0.930	0.700	nb	nb	nb	nb	nb	



Tabelle 8-16: IC<sub>50</sub>-Werte [ $\mu$ M] der Verbindungen **12v-ad** und **13a,b** an verschiedenen tumorrelevanten Kinasen

Nr.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	cMet	AXL	FAK					PRK1	VEGF-R2	TYRO3
						aa2-1052	SRC	IGF1-R	PIM1				
12v	H	2-Cl-Phenyl	H	81.1	84.2	28.8	2.94	2.43	> 100	> 100	2.49	nb	nb
12w	H	Phenyl	H	> 100	50.3	11.9	43.4	6.62	> 100	> 100	5.92	nb	nb
12x	H	2,4-di-Cl-Phenyl	H	> 100	8.62	3.65	nb	nb	nb	nb	2.99	nb	nb
12y	H	Benzyl	H	> 100	> 100	43.0	32.4	nb	nb	nb	nb	nb	nb
12z	H	4-Pyridyl	H	> 100	24.0	26.1	18.6	nb	nb	nb	nb	nb	nb
12aa	H	Furyl	H	> 100	39.7	23.4	10.7	nb	nb	nb	nb	nb	nb
12ab	F	2-Cl-Phenyl	H	> 100	18.2	6.72	nb	nb	nb	nb	8.15	nb	nb
12ac	F	2,4-di-Cl-Phenyl	H	> 100	14.2	> 100	nb	nb	nb	nb	3.31	16.0	16.0
12ad	F	4-Pyridyl	H	>100	> 100	> 100	nb	nb	nb	nb	> 100	> 100	> 100
13a	F	4-Cl-Phenyl	NH <sub>2</sub>	21.7	51.7	> 100	nb	nb	nb	nb	12.1	26.8	26.8
13b	F	2,4-di-Cl-Phenyl	NH <sub>2</sub>	> 100	78.6	29.5	nb	nb	nb	nb	12.7	13.5	13.5

Tabelle 8-17: IC<sub>50</sub>-Werte [ $\mu$ M] der Verbindungen **14** und **15a-c** an verschiedenen tumorrelevanten Kinasen

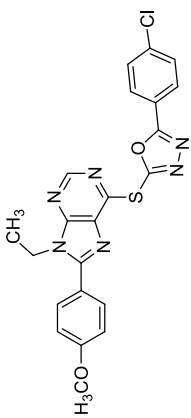
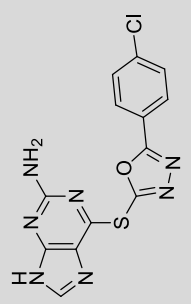
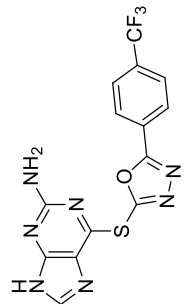
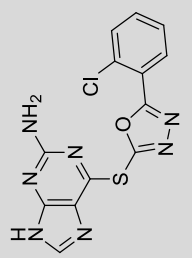
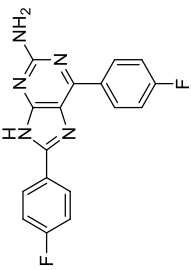
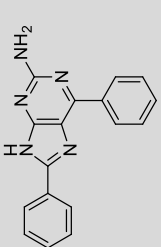
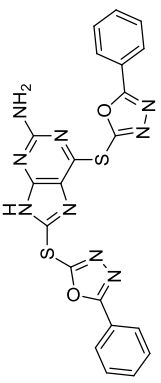
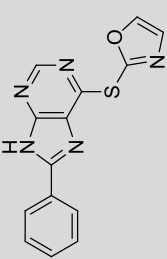
Nr.	Struktur	cMet	AXL	FAK aa2- 1052	SRC	IGF1-R	PIM1	PRK1	VEGF-R2	TYRO3
<b>14</b>		> 100	> 100	> 100	nb	nb	nb	nb	21.4	> 100
<b>15a</b>		> 100	> 100	> 100	nb	nb	nb	nb	21.5	> 100
<b>15b</b>		> 100	> 100	> 100	nb	nb	nb	nb	25.0	94.7
<b>15c</b>		> 100	31.1	36.3	nb	nb	nb	nb	29.4	> 100

Tabelle 8-18: IC<sub>50</sub>-Werte [ $\mu$ M] der Verbindungen **24a,b**, **27** und **38** an verschiedenen tumorrelevanten Kinasen

Nr.	Struktur	cMet	AXL	FAK aa2- 1052	SRC	IGF1-R	PIM1	PRK1	VEGF-R2	TYRO3
<b>24a</b>		14.8	3.07	32.6	nb	nb	nb	nb	1.00	9.42
<b>24b</b>		15.7	2.85	18.6	nb	nb	nb	nb	0.545	10.2
<b>27</b>		61.3	72.5	> 100	nb	nb	nb	nb	27.8	> 100
<b>38</b>		> 100	> 100	> 100	27.1	> 100	> 100	> 100	78.4	nb



## 9. Literaturverzeichnis

- 1 Morris, S. W.; Naeve, C.; Mathew, P.; James, P. L.; Kirstein, M. N.; Cui, X.; Witte, D. P.: ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene* **1997**, 14, 2175-2188.
- 2 Iwahara, T.; Fujimoto, J.; Wen, D.; Cupples, R.; Bucay, N.; Arakawa, T.; Mori, S.; Ratzkin, B.; Yamamoto, T.: Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene* **1997**, 14, 439-449.
- 3 Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S.: The protein kinase complement of the human genome. *Science* **2002**, 298, 1912-1934.
- 4 Morris, S. W.; Kirstein, M. N.; Valentine, M. B.; Dittmer, K. G.; Shapiro, D. N.; Saltman, D. L.; Look, A. T.: Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* **1994**, 263, 1281-1284.
- 5 Hallberg, B.; Palmer, R. H.: Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, 13, 685-700.
- 6 Mossé, Y. P.; Wood, A.; Maris, J. M.: Inhibition of ALK signaling for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **2009**, 15, 5609-5614.
- 7 Stoica, G. E.; Kuo, A.; Powers, C.; Bowden, E. T.; Sale, E. B.; Riegel, A. T.; Wellstein, A.: Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 35990-35998.
- 8 Stoica, G. E.; Kuo, A.; Aigner, A.; Sunitha, I.; Souttou, B.; Malerczyk, C.; Caughey, D. J.; Wen, D.; Karavanov, A.; Riegel, A. T.; Wellstein, A.: Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 16772-16779.
- 9 Murray, P. B.; Lax, I.; Reshetnyak, A.; Ligon, G. F.; Lillquist, J. S.; Natoli, E. J., Jr.; Shi, X.; Folta-Stogniew, E.; Gunel, M.; Alvarado, D.; Schlessinger, J.: Heparin is an activating ligand of the orphan receptor tyrosine kinase ALK. *Sci. Signaling* **2015**, 8, ra6/1-ra6/8.

- 10 Ferreri, A. J. M.; Govi, S.; Pileri, S. A.; Savage, K. J.: Anaplastic large cell lymphoma, ALK-positive. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2012**, 83, 293-302.
- 11 Hernández, L.; Pinyol, M.; Hernández, S.; Beà, S.; Pulford, K.; Rosenwald, A.; Lamant, L.; Falini, B.; Ott, G.; Mason, D. Y.; Delsol, G.; Campo, E.: TRK-Fused gene (TFG) is a new partner of ALK in anaplastic large cell lymphoma producing two structurally different TFG-ALK translocations. *Blood* **1999**, 94, 3265-3268.
- 12 Lamant, L.; Dastugue, N.; Pulford, K.; Delsol, G.; Mariamé, B.: A new fusion gene TPM3-ALK in anaplastic large cell lymphoma created by a (1;2)(q25;p23) translocation. *Blood* **1999**, 93, 3088-3095.
- 13 Meech, S. J.; McGavran, L.; Odom, L. F.; Liang, X.; Meltesen, L.; Gump, J.; Wei, Q.; Carlsen, S.; Hunger, S. P.: Unusual childhood extramedullary hematologic malignancy with natural killer cell properties that contains tropomyosin 4–anaplastic lymphoma kinase gene fusion. *Blood* **2001**, 98, 1209-1216.
- 14 Soda, M.; Choi, Y. L.; Enomoto, M.; Takada, S.; Yamashita, Y.; Ishikawa, S.; Fujiwara, S.-i.; Watanabe, H.; Kurashina, K.; Hatanaka, H.; Bando, M.; Ohno, S.; Ishikawa, Y.; Aburatani, H.; Niki, T.; Sohara, Y.; Sugiyama, Y.; Mano, H.: Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* **2007**, 448, 561-566.
- 15 Kwak, E.; Bang, Y.; Camidge, D.; Shaw, A.; Solomon, B.; Maki, R.: Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **2010**, 363, 1693-1703.
- 16 Torre, L. A.; Bray, F.; Siegel, R. L.; Ferlay, J.; Lortet-Tieulent, J.; Jemal, A.: Global cancer statistics, 2012. *Ca-Cancer J. Clin.* **2015**, 65, 87-108.
- 17 Shaw, A. T.; Yeap, B. Y.; Mino-Kenudson, M.; Digumarthy, S. R.; Costa, D. B.; Heist, R. S.; Solomon, B.; Stubbs, H.; Admane, S.; McDermott, U.; Settleman, J.; Kobayashi, S.; Mark, E. J.; Rodig, S. J.; Chirieac, L. R.; Kwak, E. L.; Lynch, T. J.; Iafrate, A. J.: Clinical features and outcome of patients with non–small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J. Clin. Oncol.* **2009**, 27, 4247-4253.
- 18 Griffin, C. A.; Hawkins, A. L.; Dvorak, C.; Henkle, C.; Ellingham, T.; Perlman, E. J.: Recurrent involvement of 2p23 in inflammatory myofibroblastic tumors. *Cancer Res.* **1999**, 59, 2776-2780.

- 19 Coffin, C. M.; Patel, A.; Perkins, S.; Elenitoba-Johnson, K. S.; Perlman, E.; Griffin, C. A.: ALK1 and p80 expression and chromosomal rearrangements involving 2p23 in inflammatory myofibroblastic tumor. *Mod. Pathol.* **2001**, 14, 569-76.
- 20 Lawrence, B.; Perez-Atayde, A.; Hibbard, M.; Rubin, B.; Dal Cin, P.; Pinkus, J.: TPM3-ALK and TPM4-ALK oncogenes in inflammatory myofibroblastic tumors. *Am. J. Pathol.* **2000**, 157, 377-384.
- 21 Wang, W.-C.; Shiao, H.-Y.; Lee, C.-C.; Fung, K.-S.; Hsieh, H.-P.: Anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitors: a review of design and discovery. *MedChemComm* **2014**, 5, 1266-1279.
- 22 Lee, C. C.; Jia, Y.; Li, N.; Sun, X.; Ng, K.; Ambing, E.; Gao, M.-Y.; Hua, S.; Chen, C.; Kim, S.; Michellys, P.-Y.; Lesley, S. A.; Harris, J. L.; Spraggon, G.: Crystal structure of the ALK (anaplastic lymphoma kinase) catalytic domain. *Biochem. J.* **2010**, 430, 425-437.
- 23 Mosse, Y. P.; Laudenslager, M.; Longo, L.; Cole, K. A.; Wood, A.; Attiyeh, E. F.; Laquaglia, M. J.; Sennett, R.; Lynch, J. E.; Perri, P.; Laureys, G.; Speleman, F.; Kim, C.; Hou, C.; Hakonarson, H.; Torkamani, A.; Schork, N. J.; Brodeur, G. M.; Tonini, G. P.; Rappaport, E.; Devoto, M.; Maris, J. M.: Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* **2008**, 455, 930-935.
- 24 Ogawa, S.; Takita, J.; Sanada, M.; Hayashi, Y.: Oncogenic mutations of ALK in neuroblastoma. *Cancer Sci.* **2011**, 102, 302-308.
- 25 Carén, H.; Abel, F.; Kogner, P.; Martinsson, T.: High incidence of DNA mutations and gene amplifications of the ALK gene in advanced sporadic neuroblastoma tumours. *Biochem. J.* **2008**, 416, 153-159.
- 26 Osajima-Hakomori, Y.; Miyake, I.; Ohira, M.; Nakagawara, A.; Nakagawa, A.; Sakai, R.: Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Am. J. Pathol.* **2005**, 167, 213-222.
- 27 Adam, P.; Katzenberger, T.; Seeberger, H.; Gattenlohner, S.; Wolf, J.; Steinlein, C.; Schmid, M.; Muller-Hermelink, H.-K.; Ott, G.: A case of a diffuse large B-cell lymphoma of plasmablastic type associated with the t(2;5)(p23;q35) chromosome translocation. *Am. J. Surg. Pathol.* **2003**, 27, 1473-6.
- 28 Onciu, M.; Behm, F.; Downing, J.; Shurtleff, S.; Raimondi, S.; Ma, Z.: ALK-positive plasmablastic B-cell lymphoma with expression of the NPM-ALK fusion transcript: report of 2 cases. *Blood* **2003**, 102, 2642-2644.

- 29 Kalia, M.: Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metab., Clin. Exp.* **2014**, 3, 16-21.
- 30 Nalejska, E.; Mączyńska, E.; Lewandowska, M.: Prognostic and predictive biomarkers: tools in personalized oncology. *Mol. Diagn. Ther.* **2014**, 18, 273-284.
- 31 Toyokawa, G.; Seto, T.: Anaplastic lymphoma kinase rearrangement in lung cancer: Its biological and clinical significance. *Respi. Investig.* **2014**, 52, 330-338.
- 32 The UniProt Consortium. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9UM73#structure> (abgerufen am 20.08.2015).
- 33 Friboulet, L.; Li, N.; Katayama, R.; Lee, C. C.; Gainor, J. F.; Crystal, A. S.; Michellys, P.-Y.; Awad, M. M.; Yanagitani, N.; Kim, S.; Pferdekamper, A. C.; Li, J.; Kasibhatla, S.; Sun, F.; Sun, X.; Hua, S.; McNamara, P.; Mahmood, S.; Lockerman, E. L.; Fujita, N.; Nishio, M.; Harris, J. L.; Shaw, A. T.; Engelman, J. A.: The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discovery* **2014**, 4, 662-673.
- 34 Roskoski, R.: Anaplastic lymphoma kinase (ALK): structure, oncogenic activation, and pharmacological inhibition. *Pharmacol. Res.* **2013**, 68, 68-94.
- 35 Zuccotto, F.; Ardini, E.; Casale, E.; Angiolini, M.: Through the “gatekeeper door”: exploiting the active kinase conformation. *J. Med. Chem.* **2009**, 53, 2681-2694.
- 36 Vijayan, R. S. K.; He, P.; Modi, V.; Duong-Ly, K. C.; Ma, H.; Peterson, J. R.; Dunbrack, R. L.; Levy, R. M.: Conformational analysis of the DFG-out kinase motif and biochemical profiling of structurally validated type II inhibitors. *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 466-479.
- 37 Shaw, A.; Kim, D.; Nakagawa, K.; Seto, T.; Crino, L.; Ahn, M.: Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **2013**, 368, 2385-2394.
- 38 Camidge, D. R.; Doebele, R. C.: Treating ALK-positive lung cancer-early successes and future challenges. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2012**, 9, 268-277.
- 39 Choi, Y.; Soda, M.; Yamashita, Y.; Ueno, T.; Takashima, J.; Nakajima, T.: EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N. Engl. J. Med.* **2010**, 363, 1734-1739.



- 40 Doebele, R. C.; Pilling, A. B.; Aisner, D. L.; Kutateladze, T. G.; Le, A. T.; Weickhardt, A. J.; Kondo, K. L.; Linderman, D. J.; Heasley, L. E.; Franklin, W. A.; Varella-Garcia, M.; Camidge, D. R.: Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **2012**, 18, 1472-1482.
- 41 Katayama, R.; Shaw, A.; Khan, T.; Mino-Kenudson, M.; Solomon, B.; Halmos, B.: Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung cancers. *Sci. Transl. Med.* **2012**, 4, 120ra117.
- 42 Toyokawa, G.; Seto, T.: Updated evidence on the mechanisms of resistance to ALK inhibitors and strategies to overcome such resistance: clinical and preclinical data. *Oncol. Res. Treat.* **2015**, 38, 291-298.
- 43 Pao, W.; Miller, V. A.; Politi, K. A.; Riely, G. J.; Somwar, R.; Zakowski, M. F.; Kris, M. G.; Varmus, H.: Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med.* **2005**, 2, e73.
- 44 Gorre, M. E.; Mohammed, M.; Ellwood, K.; Hsu, N.; Paquette, R.; Rao, P. N.; Sawyers, C. L.: Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* **2001**, 293, 876-880.
- 45 Katayama, R.; Khan, T. M.; Benes, C.; Lifshits, E.; Ebi, H.; Rivera, V. M.; Shakespeare, W. C.; Iafrate, A. J.; Engelman, J. A.; Shaw, A. T.: Therapeutic strategies to overcome crizotinib resistance in non-small cell lung cancers harboring the fusion oncogene EML4-ALK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, 108, 7535-7540.
- 46 Isozaki, H.; Takigawa, N.; Kiura, K.: Mechanisms of acquired resistance to ALK inhibitors and the rationale for treating ALK-positive lung cancer. *Cancers* **2015**, 7, 763.
- 47 Costa, D. B.; Kobayashi, S.; Pandya, S. S.; Yeo, W.-L.; Shen, Z.; Tan, W.; Wilner, K. D.: CSF concentration of the anaplastic lymphoma kinase inhibitor crizotinib. *J. Clin. Oncol.* **2011**, 29, e443-e445.
- 48 Gainor, J. F.; Ou, S.-H. I.; Logan, J.; Borges, L. F.; Shaw, A. T.: The central nervous system as a sanctuary site in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2013**, 8, 1570-1573.
- 49 Maillet, D.; Martel-Lafay, I.; Arpin, D.; Pérol, M.: Ineffectiveness of crizotinib on brain metastases in two cases of lung adenocarcinoma with EML4-ALK rearrangement. *J. Thorac. Oncol.* **2013**, 8, e30-e31.

- 50 Huang, Q.; Johnson, T. W.; Bailey, S.; Brooun, A.; Bunker, K. D.; Burke, B. J.; Collins, M. R.; Cook, A. S.; Cui, J. J.; Dack, K. N.; Deal, J. G.; Deng, Y.-L.; Dinh, D.; Engstrom, L. D.; He, M.; Hoffman, J.; Hoffman, R. L.; Johnson, P. S.; Kania, R. S.; Lam, H.; Lam, J. L.; Le, P. T.; Li, Q.; Lingardo, L.; Liu, W.; Lu, M. W.; McTigue, M.; Palmer, C. L.; Richardson, P. F.; Sach, N. W.; Shen, H.; Smeal, T.; Smith, G. L.; Stewart, A. E.; Timofeevski, S.; Tsaparikos, K.; Wang, H.; Zhu, H.; Zhu, J.; Zou, H. Y.; Edwards, M. P.: Design of potent and selective inhibitors to overcome clinical anaplastic lymphoma kinase mutations resistant to crizotinib. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 1170-1187.
- 51 Cui, J.; Tran-Dube, M.; Shen, H.; Nambu, M.; Kung, P.; Pairish, M.: Structure based drug design of crizotinib (PF-02341066), a potent and selective dual inhibitor of mesenchymal-epithelial transition factor (c-MET) kinase and anaplastic lymphoma kinase (ALK). *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 6342-6363.
- 52 Camidge, D. R.; Bang, Y.-J.; Kwak, E. L.; Iafrate, A. J.; Varella-Garcia, M.; Fox, S. B.; Riely, G. J.; Solomon, B.; Ou, S.-H. I.; Kim, D.-W.; Salgia, R.; Fidias, P.; Engelman, J. A.; Gandhi, L.; Jänne, P. A.; Costa, D. B.; Shapiro, G. I.; LoRusso, P.; Ruffner, K.; Stephenson, P.; Tang, Y.; Wilner, K.; Clark, J. W.; Shaw, A. T.: Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *Lancet Oncol.* **2012**, 13, 1011-1019.
- 53 Christensen, J. G.; Zou, H. Y.; Arango, M. E.; Li, Q.; Lee, J. H.; McDonnell, S. R.; Yamazaki, S.; Alton, G. R.; Mroczkowski, B.; Los, G.: Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, 6, 3314-3322.
- 54 Zou, H. Y.; Li, Q.; Lee, J. H.; Arango, M. E.; McDonnell, S. R.; Yamazaki, S.; Koudriakova, T. B.; Alton, G.; Cui, J. J.; Kung, P.-P.; Nambu, M. D.; Los, G.; Bender, S. L.; Mroczkowski, B.; Christensen, J. G.: An Orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms. *Cancer Res.* **2007**, 67, 4408-4417.
- 55 Kazandjian, D.; Blumenthal, G. M.; Chen, H.-Y.; He, K.; Patel, M.; Justice, R.; Keegan, P.; Pazdur, R.: FDA approval summary: crizotinib for the treatment of metastatic non-small cell lung cancer with anaplastic lymphoma kinase rearrangements. *Oncologist* **2014**, 19, e5-e11.

- 56 Johnson, T. W.; Richardson, P. F.; Bailey, S.; Brooun, A.; Burke, B. J.; Collins, M. R.; Cui, J. J.; Deal, J. G.; Deng, Y.-L.; Dinh, D.; Engstrom, L. D.; He, M.; Hoffman, J.; Hoffman, R. L.; Huang, Q.; Kania, R. S.; Kath, J. C.; Lam, H.; Lam, J. L.; Le, P. T.; Lingardo, L.; Liu, W.; McTigue, M.; Palmer, C. L.; Sach, N. W.; Smeal, T.; Smith, G. L.; Stewart, A. E.; Timofeevski, S.; Zhu, H.; Zhu, J.; Zou, H. Y.; Edwards, M. P.: Discovery of (10R)-7-Amino-12-fluoro-2,10,16-trimethyl-15-oxo-10,15,16,17-tetrahydro-2H-8,4-(metheno)pyrazolo[4,3-h][2,5,11]-benzoxadiazacyclotetradecine-3-carbonitrile (PF-06463922), a macrocyclic inhibitor of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and c-ros oncogene 1 (ROS1) with preclinical brain exposure and broad-spectrum potency against ALK-resistant mutations. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 4720-4744.
- 57 Zou, H. Y.; Engstrom, L. R.; Li, Q.; West Lu, M.; Tang, R. W.; Wang, H.; Tsaparikos, K.; Timofeevski, S.; Lam, J.; Yamazaki, S.; Hu, W.; Gukasyan, H.; Lee, N.; Johnson, T. W.; Fantin, V.; Smeal, T.: Abstract 277: PF-06463922, a novel ROS1/ALK inhibitor, demonstrates sub-nanomolar potency against oncogenic ROS1 fusions and capable of blocking the resistant ROS1<sup>G2032R</sup> mutant in preclinical tumor models. *Mol. Cancer. Ther.* **2013**, 12, Supplement zu Issue 11, Abstract 277.
- 58 U.S. National Institutes of Health. Clinicaltrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/> (abgerufen am 20.08.2015).
- 59 Ceritinib Gains FDA Approval for Lung Cancer. *Cancer Discovery* **2014**, 4, 753-754.
- 60 Galkin, A. V.; Melnick, J. S.; Kim, S.; Hood, T. L.; Li, N.; Li, L.; Xia, G.; Steensma, R.; Chopiuk, G.; Jiang, J.; Wan, Y.; Ding, P.; Liu, Y.; Sun, F.; Schultz, P. G.; Gray, N. S.; Warmuth, M.: Identification of NVP-TAE684, a potent, selective, and efficacious inhibitor of NPM-ALK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, 104, 270-275.
- 61 Marsilje, T.; Pei, W.; Chen, B.; Lu, W.; Uno, T.; Jin, Y.: Synthesis, structure-activity relationships, and in vivo efficacy of the novel potent and selective anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor 5-chloro-N2-(2-isopropoxy-5-methyl-4-(piperidin-4-yl)phenyl)-N4-(2-(isopropylsulfonyl)phenyl)pyrimidine-2,4-diamine (LDK378) currently in phase 1 and phase 2 clinical trials. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 5675-5690.
- 62 Shaw, A.; Kim, D.; Mehra, R.; Tan, D.; Felip, E.; Chow, L.: Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **2014**, 370, 1189-1197.
- 63 Li, S.; Qi, X.; Huang, Y.; Liu, D.; Zhou, F.; Zhou, C.: Ceritinib (LDK378): a potent alternative to crizotinib for ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *Clin. Lung Cancer* **2015**, 16, 86-91.

- 64 Kinoshita, K.; Asoh, K.; Furuichi, N.; Ito, T.; Kawada, H.; Hara, S.: Design and synthesis of a highly selective, orally active and potent anaplastic lymphoma kinase inhibitor (CH5424802). *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 1271-1280.
- 65 Sakamoto, H.; Tsukaguchi, T.; Hiroshima, S.; Kodama, T.; Kobayashi, T.; Fukami, Takaaki A.; Oikawa, N.; Tsukuda, T.; Ishii, N.; Aoki, Y.: CH5424802, a selective ALK inhibitor capable of blocking the resistant gatekeeper mutant. *Cancer Cell* **2011**, 19, 679-690.
- 66 McKeage, K.: Alectinib: a review of its use in advanced ALK-rearranged non-small cell lung cancer. *Drugs* **2015**, 75, 75-82.
- 67 Seto, T.; Kiura, K.; Nishio, M.; Nakagawa, K.; Maemondo, M.; Inoue, A.: CH5424802 (RO5424802) for patients with ALK-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (AF-001JP study): a single-arm, open-label, phase 1-2 study. *Lancet Oncol.* **2013**, 14, 590-598.
- 68 Gadgeel, S.; Gandhi, L.; Riely, G.; Chiappori, A.; West, H.; Azada, M.: Safety and activity of alectinib against systemic disease and brain metastases in patients with crizotinib-resistant ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (AF-002JG): results from the dose-finding portion of a phase 1/2 study. *Lancet Oncol.* **2014**, 15, 1119-1128.
- 69 De Braud, F. G.; Pilla, L.; Niger, M.; Damian, S.; Bardazza, B.; Martinetti, A.; Pelosi, G.; Marrapese, G.; Palmeri, L.; Cerea, G.; Valtorta, E.; Veronese, S.; Sartore-Bianchi, A.; Ardini, E.; Martignoni, M.; Galvani, A.; Pearson, P.; Luo, D.; Freddo, J. L.; Siena, S.: Phase 1 open label, dose escalation study of RXDX101, an oral pan-trk, ROS1, and ALK inhibitor, in patients with advanced solid tumors with relevant molecular alterations. *J. Clin. Oncol.* **2014**, 32, Supplement zu Issue 15, Abstract 2502.
- 70 Ardini, E.; Menichincheri, M.; Banfi, P.; Saccardo, M. B.; Rusconi, L.; Avanzi, N.; Amboldi, N.; Casero, D.; Cribioli, S.; Isacchi, A.; Donati, D.; Pesenti, E.; Galvani, A.: Abstract A232: In vitro and in vivo activity of NMS-E628 against ALK mutations resistant to Xalkori. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, 10, Supplement zu Issue 11, Abstract 232.
- 71 Ardini, E.; Menichincheri, M.; De Ponti, C.; Amboldi, N.; Saccardo, M.; Texido, G.: Abstract A243: Characterization of NMS-E628, a small molecule inhibitor of anaplastic lymphoma kinase with antitumor efficacy in ALK-dependent lymphoma and non-small cell lung cancer models. *Mol. Cancer Ther.* **2009**, 8, Supplement zu Issue 12, Abstract 243.

- 72 Zhang, P.; Dong, J.; Zhong, B.; Zhang, D.; Jin, C.; Meng, X.; Sun, D.; Xu, X.; Zhou, Y.; Liang, Z.; Ji, M.; Li, H.; Xu, T.; Song, G.; Zhang, L.; Chen, G.; Yuan, H.; Shih, J.; Zhang, R.; Hou, G.; Jin, Y.; Yang, Q.: Discovery of 2-aryl-amino-4-(1-methyl-3-isopropylsulfonyl-4-pyrazol-amino)pyrimidines as potent anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 3738-3743.
- 73 Crescenzo, R.; Inghirami, G.: Anaplastic lymphoma kinase inhibitors. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2015**, 23, 39-44.
- 74 Squillace, R. M.; Anjum, R.; Miller, D.; Vodala, S.; Moran, L.; Wang, F.; Clackson, T.; Garner, A. P.; Rivera, V. M.: Abstract 5655: AP26113 possesses pan-inhibitory activity versus crizotinib-resistant ALK mutants and oncogenic ROS1 fusions. *Cancer Res.* **2013**, 73, Supplement zu Issue 8, Abstract 5655.
- 75 Camidge, D. R.; Bazhenova, L.; Salgia, R.; Langer, C. J.; Gold, K. A.; Rosell, R.; Shaw, A. T.; Weiss, G. J.; Narasimhan, N. I.; Dorer, D. J.; Rivera, V. M.; Clackson, T. P.; Conlan, M. G.; Kerstein, D.; Haluska, F. G.; Gettinger, S. N.: Safety and efficacy of brigatinib (AP26113) in advanced malignancies, including ALK+ non-small cell lung cancer (NSCLC). *J. Clin. Oncol.* **2015**, 33, Supplement zu Issue 15, Abstract 8062.
- 76 Lovly, C.; Heuckmann, J.; De Stanchina, E.; Chen, H.; Thomas, R.; Liang, C.: Insights into ALK-driven cancers revealed through development of novel ALK tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res.* **2011**, 71, 4920 - 4931.
- 77 Horn, L.; Infante, J. R.; Blumenschein, G. R.; Wakelee, H. A.; Arkenau, H.-T.; Dukart, G.; Liang, C.; Harrow, K.; Gibbons, J.; Lovly, C. M.; Pao, W.: A phase I trial of X-396, a novel ALK inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* **2014**, 32, Supplement zu Issue 15, Abstract 8030.
- 78 Wilcoxon, K. M.; Brake, R. L.; Saffran, D.; Teffera, Y.; Choquette, D.; Whittington, D.; Yu, V.; Romero, K.; Bode, C.; Stellwagen, J.; Potashman, M.; Emkey, R.; Andrews, P.; Drew, A. E.; Xu, M.; Szilvassy, S.; Al-Assad, S.; Lewis, R. T.: Abstract 1795: Characterization of a novel series of potent, selective inhibitors of wild type and mutant/fusion anaplastic lymphoma kinase. *Cancer Res.* **2012**, 72, Supplement zu Issue 8, Abstract 1795.
- 79 Weiss, G. J.; Sachdev, J. C.; Infante, J. R.; Mita, M. M.; Natale, R. B.; Arkenau, H.-T.; Wilcoxon, K.; Kansra, V.; Laken, H.; Hughes, L.; Brooks, D. G.; Martell, R. E.; Anthony, S. P.: Phase (Ph) 1/2 study of TSR-011, a potent inhibitor of ALK and TRK, including crizotinib-resistant ALK mutations. *J. Clin. Oncol.* **2014**, 32, Supplement zu Issue 15, Abstract e19005.

- 80 Arkenau, H.-T.; Sachdev, J. C.; Mita, M. M.; Dziadziuszko, R.; Lin, C.-C.; Yang, J. C.; Infante, J. R.; Anthony, S. P.; Voskoboynik, M.; Su, W.-C.; De Castro, J.; Natale, R. B.; Zhang, Z.-Y.; Hughes, L.; Bobilev, D.; Weiss, G. J.: Phase (Ph) 1/2a study of TSR-011, a potent inhibitor of ALK and TRK, in advanced solid tumors including crizotinib-resistant ALK positive non-small cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **2015**, 33, Supplement zu Issue 15, Abstract 8063.
- 81 Jacobs, M. J.; Ott, G. R.: Preparation of fused bicyclic 2,4-diaminopyrimidine derivatives as a dual ALK and FAK inhibitor. WO2013134353A1, **2013**.
- 82 Bossi, R. T.; Saccardo, M. B.; Ardini, E.; Menichincheri, M.; Rusconi, L.; Magnaghi, P.; Orsini, P.; Avanzi, N.; Borgia, A. L.; Nesi, M.; Bandiera, T.; Fogliatto, G.; Bertrand, J. A.: Crystal structures of anaplastic lymphoma kinase in complex with ATP competitive inhibitors. *Biochemistry* **2010**, 49, 6813-6825.
- 83 Kubbutat, M.; Schaechtele, C.; Ehlert, J.; Totzke, F.; Kunick, C.; Woelfel, S.; Weber, H.: Preparation of thioether derivatives as protein kinase inhibitors. WO2014079545A1, **2014**.
- 84 Wölfel, S.: *Neue Inhibitoren der Anaplastic Lymphoma Kinase*. Shaker Verlag: Aachen, **2014**.
- 85 Klebe, G.: *Wirkstoffdesign - Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, **2009**, 310-312.
- 86 Jones, G.; Willett, P.: Docking small-molecule ligands into active sites. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1995**, 6, 652-656.
- 87 Sousa, S. F.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J.: Protein–ligand docking: Current status and future challenges. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2006**, 65, 15-26.
- 88 Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R.: Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, 267, 727-748.
- 89 Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.: Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J. Mol. Biol.* **1995**, 245, 43-53.
- 90 Eldridge, M.; Murray, C.; Auton, T.; Paolini, G.; Mee, R.: Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1997**, 11, 425-445.

- 91 GOLD User Guide.  
<https://www.ccdc.cam.ac.uk/Lists/DocumentationList/gold.pdf> (abgerufen am 08.10.2015).
- 92 PDB - Protein Data Bank. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (abgerufen am 08.08.2015).
- 93 Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D.: Improved protein–ligand docking using GOLD. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2003**, 52, 609-623.
- 94 PyMOL Molecular Graphic System, Version 0.99rc6, Schrödinger, **2006** DeLano Scientific LLC.
- 95 Jeffrey, G. A.: *An introduction to hydrogen bonding*. Oxford University Press: New York, **1997**, 11-16.
- 96 Desiraju, G. R.: A bond by any other name. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2011**, 50, 52-59.
- 97 Baxter, I.; M. Colquhoun, H.; Hodge, P.; H. Kohnke, F.; J. Williams, D.: Macrocyclic aromatic thioether sulfones. *Chem. Commun.* **1998**, 283-284.
- 98 Ōae, S.; Doi, J. T.: *Organic sulfur chemistry: structure and mechanism*. CRC Press: Boca Raton, **1991**, 4-5.
- 99 Beyer, H.; Walter, W.: *Lehrbuch der organischen Chemie*. 24. Auflage, Hirzel Verlag: Stuttgart, **2004**, 852-853.
- 100 Traube, W.: Der synthetische Aufbau der Harnsäure, des Xanthins, Theobromins, Theophyllins und Caffeins aus der Cyanessigsäure. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1900**, 33, 3035-3056.
- 101 Traube, W.: Ueber eine neue Synthese des Guanins und Xanthins. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1900**, 33, 1371-1383.
- 102 Lai, Y.; Liang, J.; Magnuson, S. R.; H., T. V.; Zhang, B.; K., R.: Imidazopyridine compounds, compositions and methods of use. WO 2011/113802 A2, **2011**.
- 103 Liu, J.; Dang, Q.; Wei, Z.; Shi, F.; Bai, X.: An efficient and regiospecific strategy to *N*7-substituted purines and its application to a library of trisubstituted purines. *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 410-416.

- 104 Robins, R. K.; Dille, K. J.; Willits, C. H.; Christensen, B. E.: Purines. II. The synthesis of certain purines and the cyclization of several substituted 4,5-diaminopyrimidines. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 263-266.
- 105 Yang, J.; Dang, Q.; Liu, J.; Wei, Z.; Wu, J.; Bai, X.: Preparation of a fully substituted purine library. *J. Comb. Chem.* **2005**, 7, 474-482.
- 106 Ibrahim, N.; Legraverend, M.: High-yielding two-step synthesis of 6,8-disubstituted *N*-9-unprotected purines. *J. Comb. Chem.* **2009**, 11, 658-666.
- 107 Chenon, M. T.; Pugmire, R. J.; Grant, D. M.; Panzica, R. P.; Townsend, L. B.: Carbon-13 magnetic resonance. XXVI. Quantitative determination of the tautomeric populations of certain purines. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 4636-4642.
- 108 Sečkářová, P.; Marek, R.; Maliňáková, K.; Kolehmainen, E.; Hocková, D.; Hocek, M.; Sklenář, V.: Direct determination of tautomerism in purine derivatives by low-temperature NMR spectroscopy. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 6259-6263.
- 109 Shcherbakova, I.; Elguero, J.; Katritzky, A. R.: Tautomerism of heterocycles: Condensed five-six, five-five, and six-six ring systems with heteroatoms in both rings. *Adv. Heterocycl. Chem.* **2000**, 77, 51-113.
- 110 Thorpe, M. C.; Coburn Jr, W. C.; Montgomery, J. A.: The  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectra of some 2-, 6-, and 2,6-substituted purines. *J. Magn. Reson.* **1974**, 15, 98-112.
- 111 Bartl, T.; Zacharova, Z.; Seckarova, P.; Kolehmainen, E.; Marek, R.: NMR quantification of tautomeric populations in biogenic purine bases. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 1377-1383.
- 112 Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B.: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 7. Auflage, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, **2005**, 99-104.
- 113 Dilek Celik, G.; Disli, A.; Oner, Y.; Acik, L.: Synthesis of some novel amino and thiotetrazole purine derivatives and investigation of their antimicrobial activity and DNA interactions. *Med. Chem. Res.* **2013**, 22, 1470-1479.
- 114 Aliev, A. E.; Harris, K. D. M.:  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  isotope effects in  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of chlorohydrocarbons. *Magn. Reson. Chem.* **1993**, 31, 54-57.



- 115 Matsubara, K.: Unambiguous signal assignments of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra for chlorinated benzenes using  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  isotope effects. *Magn. Reson. Chem.* **2001**, 39, 633-636.
- 116 Jang, M.-Y.; Lin, Y.; De Jonghe, S.; Gao, L.-J.; Vanderhoydonck, B.; Froeyen, M.; Rozenski, J.; Herman, J.; Louat, T.; Van Belle, K.; Waer, M.; Herdewijn, P.: Discovery of 7-*N*-piperazinylthiazolo[5,4-*d*]pyrimidine analogues as a novel class of immunosuppressive agents with in vivo biological activity. *J. Med. Chem.* **2010**, 54, 655-668.
- 117 Horner, L.; Winkelmann, E. H.: Neuere Methoden der präparativen organischen Chemie II 14. N-Bromsuccinimid, Eigenschaften und Reaktionsweisen Studien zum Ablauf der Substitution XV. *Angew. Chem.* **1959**, 71, 349-365.
- 118 Appari, R. D.; Chen, X.; Chilukuri, R.; Crew, A. P.; Dong, H.; Ferraro, C.; Foreman, K.; Gupta, R. C.; Li, A.-H.; Sherman, D.; Stolz, K. M.; Volk, B.; Zahler, R.: Preparation of aminopyrimidine derivatives for use as antitumor agents. WO2010141406A2, **2010**.
- 119 Litinas, K. E.; Thalassitis, A.: Synthesis of fused dihydropyrido[*e*]purines via ring closing metathesis. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 6451-6453.
- 120 Laxer, A.; Major, D. T.; Gottlieb, H. E.; Fischer, B.: ( $^{15}\text{N}$ 5)-Labeled adenine derivatives: synthesis and studies of tautomerism by  $^{15}\text{N}$  NMR spectroscopy and theoretical calculations. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 5463-5481.
- 121 Miyaura, N.; Suzuki, A.: Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev. (Washington, D. C.)* **1995**, 95, 2457-83.
- 122 Woodring, J. L.; Patel, G.; Erath, J.; Behera, R.; Lee, P. J.; Leed, S. E.; Rodriguez, A.; Sciotti, R. J.; Mensa-Wilmot, K.; Pollastri, M. P.: Evaluation of aromatic 6-substituted thienopyrimidines as scaffolds against parasites that cause trypanosomiasis, leishmaniasis, and malaria. *Med. Chem. Commun.* **2015**, 6, 339-346.
- 123 Bugge, S.; Kaspersen, S. J.; Sundby, E.; Hoff, B. H.: Route selection in the synthesis of C-4 and C-6 substituted thienopyrimidines. *Tetrahedron* **2012**, 68, 9226-9233.

- 124 Nagahara, K.; Anderson, J. D.; Kini, G. D.; Dalley, N. K.; Larson, S. B.; Smee, D. F.; Jin, A.; Sharma, B. S.; Jolley, W. B.; Robins, R. K.: Thiazolo[4,5-d]pyrimidine nucleosides. The synthesis of certain 3-beta-D-ribofuranosylthiazolo[4,5-d]pyrimidines as potential immunotherapeutic agents. *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 407-15.
- 125 Peng, J.; Lin, W.; Jiang, D.; Yuan, S.; Chen, Y.: Preparation of a 7-arylthieno[3,2-d]pyrimidin-4-amine library. *J. Comb. Chem.* **2007**, 9, 431-436.
- 126 Robins, M. J.; Uznanski, B.: Nucleic acid related compounds. 33. Conversions of adenosine and guanosine to 2,6-dichloro, 2-amino-6-chloro, and derived purine nucleosides. *Can. J. Chem.* **1981**, 59, 2601-2607.
- 127 Bercean, V. N.; Turlea, M.-L.; Badea, V.; Creanga, A.-A.; Medeleanu, M.: New 5-substituted 2-mercapto-1,3,4-oxadiazoles, intermediates in the synthesis of 5-substituted 4H-4-amino-3-mercapto-1,2,4-triazoles. *Rev. Chim. (Bucharest, Rom.)* **2009**, 60, 893-895.
- 128 Hanif, M.; Shoaib, K.; Saleem, M.; Hasan Rama, N.; Zaib, S.; Iqbal, J.: Synthesis, urease inhibition, antioxidant, antibacterial, and molecular docking studies of 1,3,4-oxadiazole derivatives. *ISRN Pharmacol.* **2012**, 2012, 928901.
- 129 Jansen, M.; Rabe, H.; Strehle, A.; Dieler, S.; Debus, F.; Dannhardt, G.; Akabas, M. H.; Lüddens, H.: Synthesis of GABAA receptor agonists and evaluation of their  $\alpha$ -subunit selectivity and orientation in the GABA binding site. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 4430-4448.
- 130 Manjunatha, K.; Poojary, B.; Lobo, P. L.; Fernandes, J.; Kumari, N. S.: Synthesis and biological evaluation of some 1,3,4-oxadiazole derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 5225-5233.
- 131 Buettelmann, B.; Knust, H.; Thomas, A.: Preparation of imidazo[1,5-a][1,2,4]triazolo[1,5-d][1,4]benzodiazepine derivatives as selective GABAA  $\alpha 5$  receptor ligands for the treatment of cognitive disorders. US20070082890A1, **2007**.
- 132 Tiperciuc, B.; Zaharia, V.; Colosi, I.; Moldovan, C.; Crişan, O.; Pîrnau, A.; Vlase, L.; Duma, M.; Oniga, O.: Synthesis and evaluation of antimicrobial activity of some new hetaryl-azoles derivatives obtained from 2-aryl-4-methylthiazol-5-carbohydrazides and isonicotinic acid hydrazide. *J. Heterocycl. Chem.* **2012**, 49, 1407-1414.
- 133 Aranda, G.; Dessolin, M.; Golfier, M.; Guillerez, M.-G.:  $^{13}\text{C}$  NMR study of some derivatives of 1,3,4-oxadiazoles, 1,3,4-thiadiazoles and isosydnone. *Org. Magn. Reson.* **1982**, 18, 159-164.

- 134 Horning, D. E.; Muchowski, J. M.: Five-membered heterocyclic thiones. Part I. 1,3,4-oxadiazole-2-thione. *Can. J. Chem.* **1972**, 50, 3079-3082.
- 135 Tomi, I. H. R.; Al-Qaisi, A. H. J.; Al-Qaisi, Z. H. J.: Synthesis, characterization and effect of bis-1,3,4-oxadiazole rings containing glycine moiety on the activity of some transferase enzymes. *J. King Saud Univ., Sci.* **2011**, 23, 23-33.
- 136 Wölfel, S.: *Neue Inhibitoren der Anaplastic Lymphoma Kinase*. Shaker Verlag: Aachen, **2014**, 47-49.
- 137 Tegtmeier, F.; Walter, U.; Schinzel, R.; Wingler, K.; Scheurer, P.; Schmidt, H.: Compounds containing a N-heteroaryl moiety linked to fused ring moieties for the inhibition of NAD(P)H oxidases and platelet activation. EP 1 598 354 A1, **2004**.
- 138 Watanabe, Y.: Novel preparation process of 1,3-oxazole-2-thiol. WO 03/006442 A1, **2003**.
- 139 Wölfel, S.: *Neue Inhibitoren der Anaplastic Lymphoma Kinase*. Shaker Verlag: Aachen, **2014**, 108-109.
- 140 Gedye, R.; Smith, F.; Westaway, K.; Ali, H.; Baldisera, L.; Laberge, L.; Rousell, J.: The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 279-282.
- 141 Giguere, R. J.; Bray, T. L.; Duncan, S. M.; Majetich, G.: Application of commercial microwave ovens to organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 4945-4948.
- 142 Kappe, C. O.: Kontrolliertes Erhitzen mit Mikrowellen in der modernen organischen Synthese. *Angew. Chem.* **2004**, 116, 6408-6443.
- 143 Brown, G. R.; Foubister, A. J.; Roberts, C. A.; Wells, S. L.; Wood, R.: Improved yields of meta-amination and symmetrical and unsymmetrical diamination of benzenes. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 3917-3919.
- 144 Cherng, Y.-J.: Efficient nucleophilic substitution reaction of aryl halides with amino acids under focused microwave irradiation. *Tetrahedron* **2000**, 56, 8287-8289.
- 145 Larhed, M.; Moberg, C.; Hallberg, A.: Microwave-accelerated homogeneous catalysis in organic chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 717-727.

- 146 ChemBioDraw Ultra 12.0, CambridgeSoft Corporation.
- 147 Hasan, A.; Thomas, N. F.; Gapil, S.: Synthesis, characterization and antifungal evaluation of 5-substituted-4-amino-1,2,4-triazole-3-thioesters. *Molecules* **2011**, 16, 1297-1309.
- 148 Sparkman, O. D.; Penton, Z. E.; Kitson, F. G.: *Gas Chromatography and Mass Spectrometry*. 2. Auflage, Academic Press: Amsterdam, **2010**, 519-588.
- 149 Ferenc, G.; Kele, Z.; Kovacs, L.: Determination of *N9/N7*-isomer ratio of alkyl (guaninyl)acetates by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, 19, 236-240.
- 150 Gregson, J. M.; McCloskey, J. A.: Collision-induced dissociation of protonated guanine. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1997**, 165/166, 475-485.
- 151 Kamel, A. M.; Munson, B.: Collision-induced dissociation of purine antiviral agents: mechanisms of ion formation using gas-phase hydrogen/deuterium exchange and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2004**, 10, 239-257.
- 152 Nelson, C. C.; McCloskey, J. A.: Collision-induced dissociation of adenine. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3661-8.
- 153 Keserü, G. M.; Makara, G. M.: The influence of lead discovery strategies on the properties of drug candidates. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, 8, 203-212.
- 154 Kerns, E. H.; Di, L.: *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods*. Academic Press: San Diego, **2008**, 6-16.
- 155 Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J.: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, 46, 3-26.
- 156 Arnott, J. A.; Kumar, R.; Planey, S. L.: Lipophilicity indices for drug development. *J. Appl. Biopharm. Pharmacokinet.* **2013**, 1, 31-36.
- 157 Freeman-Cook, K. D.; Hoffman, R. L.; Johnson, T. W.: Lipophilic efficiency: the most important efficiency metric in medicinal chemistry. *Future Med. Chem.* **2013**, 5, 113-115.

- 158 Leeson, P. D.; Springthorpe, B.: The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, 6, 881-890.
- 159 Wölfel, S.: *Neue Inhibitoren der Anaplastic Lymphoma Kinase*. Shaker Verlag: Aachen, **2014**, 93-94.
- 160 <http://www.chemicalize.org/> (abgerufen am 07.12.2015).
- 161 Kerns, E. H.; Di, L.: *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods*. Academic Press: San Diego, **2008**, 56-85.
- 162 Wölfel, S.: *Neue Inhibitoren der Anaplastic Lymphoma Kinase*. Shaker Verlag: Aachen, **2014**, 73-86.
- 163 Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, **2013**.
- 164 Suresh, M.; Lavanya, P.; Vasu, K.; Rao, C. V.: Synthesis of 6-chloro-8-substituted-9[H]-purine derivatives and bioactivity studies. *Org. Chem.: Indian J.* **2010**, 6, 160-165.
- 165 Chau, N.; Saegusa, Y.; Iwakura, Y.: Synthesis of substituted N-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolinyl)benzamides and N-(2-thiono-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolinyl)benzamides. *J. Heterocycl. Chem.* **1982**, 19, 541-544.
- 166 Chen, Y.; Xu, X.; Liu, X.; Yu, M.; Liu, B.-F.; Zhang, G.: Synthesis and evaluation of a series of 2-substituted-5-thiopropylpiperazine(piperidine)-1,3,4-oxadiazoles derivatives as atypical antipsychotics. *PLoS ONE* **2012**, 7, e35186.
- 167 Al-obaidi, K.; Ali, B.; Abu-El-Halawa, R.; Abo-Amer, A.: Synthesis of 1,3,4-mercapto-oxadiazole mono- and dinuclear copper(I) and copper(II) complexes and their microbiological activity. *Transition Met. Chem.* **2004**, 29, 804-811.
- 168 Hoggarth, E.: 2-Benzoyldithiocarbazinic acid and related compounds. *J. Chem. Soc.* **1952**, 4811-4817.
- 169 Liu, Z.; Zhao, J.; Huang, X.: Solid-phase synthesis of 1,3,4-oxadiazoline-5-thione derivatives from resin-bound acylhydrazines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 1828-1830.

- 170 Goswami, B. N.; Katakya, J. C. S.; Baruah, J. N.; Nath, S. C.: Synthesis of 3,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazole-2-thiones as potential fungicidal agents. *J. Heterocycl. Chem.* **1984**, 21, 205-208.
- 171 Young, R. W.; Wood, K. H.: The cyclization of 3-aryldithiocarbamate esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 400-3.
- 172 Wang, Y.-T.; Tang, G.-M.; Ma, W.-Y.; Wan, W.-Z.: Synthesis and characterization of two new coordination supramolecular structures from a versatile unsymmetric 5-(4-pyridyl)-1,3,4-oxadiazole-2-thione (Hpot) ligand. *Polyhedron* **2007**, 26, 782-790.
- 173 Hosur, M. C.; Talawar, M. B.; Laddi, U. V.; Bennur, R. S.; Bennur, S. C.: Synthesis and antimicrobial activities of some new 1,3,4-oxadiazoles. *Indian J. Heterocycl. Chem.* **1994**, 3, 237-42.
- 174 Edwards, L. H.: Insecticidal 5-thiocarbamoyl-1,3,4-oxadiazoles. US4500539A, **1985**.
- 175 Herdewijn, P.; De Jonghe, S.; Gao, L.-J.; Jang, M.-Y.; Vanderhoydonck, B.; Waer, M. J. A.; Lin, Y.; Herman, J. F.; Louat, T. A. M.: Preparation of bicyclic heterocycles, especially thiazolopyrimidines, oxazolopyrimidines, thienopyrimidines and purines for treating immune and autoimmune disorders resulting from an organ or cells transplantation. WO2010103130A2, **2010**.
- 176 Zhang, J.-H.; Chung, T. D. Y.; Oldenburg, K. R.: A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screening* **1999**, 4, 67-73.

## **Danksagung**

Ein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. C. Kunick für die Überlassung des spannenden Themas und dafür, dass er mir mit seinem Fachwissen stets beratend zur Seite stand. Ich möchte mich herzlich dafür bedanken, dass er immer ein offenes Ohr hatte und mit seiner angenehmen Art ein wertvoller Begleiter in einer bereichernden Zeit war.

Für die zuverlässige Durchführung der biologischen Testungen möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Firma ProQinase GmbH, insbesondere bei Herrn Dr. M. G. Kubbutat, Herrn Dr. C. Schächtele und Herrn Dr. F. Totzke bedanken.

Dankbar anerkennen möchte ich die Hilfsbereitschaft von Herrn Dr. L. Preu bei analytischen Fragestellungen und bei der Auswertung von NMR-Spektren.

Den Mitarbeitern vom Institut für organische Chemie der TU Braunschweig möchte ich herzlich für die Aufnahme von NMR-Spektren danken. Mein Dank gilt Frau Dr. K. Ibrom, Frau P. Holba-Schulz und Frau G. Kraft. Außerdem danke ich Herrn Dr. U. Papke, Herrn Dr. H. M. Schiebel und Frau C. Mlynek vom Institut für organische Chemie der TU Braunschweig für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen und die Beratung bei der Spektreninterpretation. Für die Anfertigung der Röntgenkristallstruktur-Analyse möchte ich Herrn Prof. P. G. Jones und seinen Mitarbeitern vom Institut für anorganische und analytische Chemie der TU Braunschweig danken.

Bei Frau S. Meyer und Frau P. Reich aus der analytischen Abteilung des Institutes für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig möchte ich mich für die Probenvorbereitung für die NMR-Experimente, die Durchführung von Elementaranalysen, die Aufnahme von FT-IR-Spektren und das Abwiegen von zahlreichen Proben bedanken. Herrn K. Hartmann, Herrn M. Söchtig, Herrn E. Hinz und Herrn F. Roese danke ich für die Versorgung mit Chemikalien und Glasgeräten, für die immer hilfsbereite technische Unterstützung und die netten Gespräche. Frau D. Eberle, Frau B. Thomas und Herr T. Hoffmann haben mich in organisatorischen Dingen sehr unterstützt.

Ein besonders herzliches Dankeschön geht an alle Mitarbeiter des Instituts für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig für die erfahrungsreiche Zeit und ausdrücklich für das angenehme Arbeitsklima. Mein großer Dank gebührt den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern meines Arbeitskreises Frau A. Lader, Frau Dr. F. Maiwald, Frau Dr. R. Korn, Herrn Dr. H. Falke, Herrn Dr. S. Wölfel, Frau Dr. A. Walter, Herrn D. H. Lande, Herrn T. Weidner, Herrn O. Orban, Herrn M. Immer, Frau R. Meine und Herrn C. Lechner. Ein besonderer Dank gilt Herrn A. Masch für das hervorragende Miteinander im gemeinsamen Labor, den wertvollen fachlichen Austausch und die konstruktive Unterstützung.

Meinen Wahlpflichtstudenten M. Schloen, A. Sängler, K. Meyer und C. Lechner danke ich für die begleitenden Tätigkeiten im Labor.

Bei dem Team vom 3. Semester möchte ich mich für die unkomplizierte und zuverlässige Zusammenarbeit im Praktikum „Chemie einschließlich der Analytik der organischen Arznei-, Hilfs- und Schadstoffe“ bedanken.

Des Weiteren bin ich dem Cusanuswerk für die finanzielle Unterstützung in Form eines Promotionsstipendiums und für die Möglichkeit der Teilnahme an interessanten Graduiertentagungen mit zahlreichen wertvollen persönlichen Begegnungen zu Dank verpflichtet.

Ein herzliches Dankeschön gilt meinen Korrekturlesern insbesondere Markus, Lutz und Andreas.

Im herzlichen Dank verbunden fühle ich mich mit meiner Familie, die mich immer wieder motiviert und fortwährend unterstützt hat.